

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 9 月 30 日 (30.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/083425 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 16/18, C12N 5/10, 5/16, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 1/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003569

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 17 日 (17.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-072714 2003 年 3 月 17 日 (17.03.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 麒麟
麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)
[JP/JP]; 〒1048288 東京都中央区新川二丁目 10 番
1 号 Tokyo (JP). 学校法人日本大学 (NIHON UNIVER-
SITY) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁
目 8 番 2 4 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田原 知幸
(TAHARA, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒3701295 群馬県高崎
市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内
Gunma (JP). 安孫子 宜光 (ABIKO, Yoshimitsu) [JP/JP];
〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号
学校法人日本大学内 Tokyo (JP). 吉江 弘正 (YOSHIE,
Hiromasa) [JP/JP]; 〒9518514 新潟県新潟市学校町通
2 番町 5274 番地 新潟大学内 Niigata (JP). 小林 哲夫
(KOBAYASHI, Tetsuo) [JP/JP]; 〒9518514 新潟県新潟
市学校町通 2 番町 5274 番地 新潟大学内 Niigata (JP).
梅本 俊夫 (UMEMOTO, Toshio) [JP/JP]; 〒2388580 神

奈川県横須賀市稲岡町 82 番地 学校法人神奈川歯科大
学内 Kanagawa (JP). 浜田 信城 (HAMADA, Nobushiro)
[JP/JP]; 〒2388580 神奈川県横須賀市稲岡町 82 番地
学校法人神奈川歯科大学内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
1050001 東京都港区虎ノ門一丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5 森
ビル 3 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDY FOR PERIODONTAL DISEASE

(54) 発明の名称: 歯周病治療剤

(57) Abstract: It is intended to provide a human monoclonal antibody (preferably a monoclonal antibody to 40-kDa OMP inhibiting the binding to hemin) which has an activity of inhibiting aggregation of the periodontal disease bacterium and an activity of promoting the bactericidal effect of leukocytes without any risk of side effects, etc., and a drug against periodontal disease which contains the above monoclonal antibody. Namely, an antibody binding to 40-kDa OMP which has at least one of the following activities: (1) an activity of inhibiting the co-aggregation of *P. gingivalis*; (2) an activity of phagocytosis of human neutrophils; and (3) an activity of inhibiting the binding of 40-kDa OMP to hemin; or a functional fragment of the antibody.

(57) 要約: 本発明は、歯周病病原菌の凝集阻害活性と白血球による殺菌促進活性とを併せ持ち、好ましくは、ヘミンの結合を阻害する 40-kDa OMP に対するモノクローナル抗体であって、さらに、副作用等の心配のないヒトモノクローナル抗体および該モノクローナル抗体を含む抗歯周病剤の提供である。本発明は、(1) *P. gingivalis* 凝集阻害活性、および (2) ヒト好中球貪食賦活性、および (3) ヘミンと 40-kDa OMP との結合阻害活性の少なくとも一つを有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片である。

WO 2004/083425 A1

明細書

歯周病治療剤

技術分野

本発明は、抗歯周病剤に関する。具体的には、本発明は歯周病病原菌の凝集阻害活性と白血球による殺菌促進活性とを併せ持ち、好ましくは、40-kDa OMP とヘミンの結合を阻害する 40-kDa OMP に対するモノクローナル抗体であって、さらに、マウス等の非ヒト動物の抗体と比較して副作用を生じる可能性が低いヒトモノクローナル抗体および該モノクローナル抗体を含む抗歯周病剤に関する。

背景技術

歯周病は国民の約 80% 以上が罹患する疾患であり、口腔内細菌の感染、歯周病病原性細菌の増加、細菌の組織内侵入及び感染に対する宿主免疫応答等が主たる原因と考えられている。歯周病は最終的には歯の喪失に至り Quality of life を損なう極めて重要な疾患である。さらに、近年、歯周病は歯牙喪失だけでなく、循環系疾患、低体重児出産・早産、糖尿病、心内膜炎、肺炎と因果関係があることが分かってきている (Abiko Y., Crit. Rev. Oral. Biol. Med., 2000 Vol 11:140)。

歯周病の治療法は感染源の排除が治療上重要であることから、ブラッシングとスケーリングといった極めて原始的な方法や歯周外科等がいままでに主流である。しかし、これらの機械的除去療法のみでは歯周病病原菌を完全に駆逐するのは不可能であり、菌血症や病巣感染をも招くことから、全身疾患を有する患者に適用できないことがある。また、テトラサイクリン、ミノサイクリン等の抗生物質や抗菌剤の投与も歯周治療として有効とされてきたが、最近では複数の耐性菌、耐性関連遺伝子、副作用等の問題が指摘されており、薬物療法の限界も示唆されている。し

たがって、歯周病に対し未だ有効な治療法が確立されていないのが現状であり、人体への安全性が高く歯周病病原菌を完全に駆逐しうる新しい治療法の開発が期待されている。

口腔細菌の中で *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は成人型歯周病患者の歯周ポケットから高頻度で分離され、歯周病の病原菌として最も有力視されている。この菌は血液平板上で黒色コロニーを形成するグラム陰性の桿菌であり、本菌体表層成分や菌体外産物が歯周組織の破壊に関わると考えられている。このため、歯周病を効果的に予防また治療するためには、*P. gingivalis* の定着を抑え、歯周ポケット内から本菌体を排除することが重要である。

P. gingivalis 駆除の方法として抗体療法が考えられる。同療法は、歯周病病原菌の病原因子に対する特異抗体を作製し、歯周ポケットに投与することで、1) 歯周ポケットへの病原菌定着の抑制、2) 歯周ポケット白血球による殺菌促進、等を期待するものである。1) について抗原は未同定であるが *P. gingivalis* に対する抗体を局所投与することで、9 カ月間同細菌の歯周ポケット内再定着を抑制できたと報告されている (Booth, V. et al., *Infect Immun.*, 1996 Vol 64:422)。このように特異抗体により歯周病病原菌定着を抑制することで、歯周病はある程度克服できる可能性がある。さらに、重度な歯周感染症で観血的処置が不可能な場合には、歯周ポケット内の白血球による殺菌促進活性 (食食賦活性) を積極的に期待するような抗体療法も必要であると考えられる。

近年、*P. gingivalis* に発現している抗原の一つとして、40-kDa Outer membrane protein (OMP) が報告されている (Abiko, Y. et al., *Arch. Oral Biol.* 1990 Vol 35:689, Kawamoto, Y. et al., *Int. J. Biochem.*, 1991 Vol 23:1053)。40-kDa OMP は、多くの *P. gingivalis* 株間で保存され発現している (Hiratsuka, K. et al., 1996. *FEMS. Microbiol. Lett.* 138:167-172)。40-kDa OMP 抗原に対するモノクローナル抗体は *P. gingivalis* と *Actinomyces viscosus* の共凝集を阻害することから、こ

の抗原は *P. gingivalis* の定着に重要な因子である (Abiko, Y. et.al., Infect. Immun., 1997 Vol 65:3966, Hiratsuka, K. et.al., Arch. Oral. Biol., 1992 Vol 37:717, Saito S. et.al., Gen. Pharmacol., 1997 Vol 28:675)。さらに、抗 40-kDa OMP ポリクローナル抗体が前骨髄球細胞株 HL60 の貪食能を賦活化する活性があることも報告されている (Saito, S. et.al, J. Periodontol., 1999 Vol 70:610)。したがって、*P. gingivalis* の共凝集阻害活性と白血球による *P. gingivalis* 貪食賦活性を有し、かつ、患者への応用を考えた場合に安全性や効果の持続性の点で優れているヒトモノクローナル抗体の提供は、新規歯周病治療法の開発に大きく貢献すると考えられる。しかし、そのような抗体は未だ全く報告されていない。一般に *P. gingivalis* の共凝集阻害活性を持つ全ての抗体が、白血球による殺菌促進活性を持つかは必ずしも明らかではない。さらに、*P. gingivalis* の生長や増殖さらには本菌の病原性発揮にヘミンの取り込みが必須であることが知られている。40kDa-OMP タンパクにはヘミン結合部位として知られている heme regulatory motif が存在し、実際、40kDa-OMP はヘミンが結合するヘミン結合タンパクの一種であることが報告されている (Shibata, Y. et.al., B. B. R. C., 2003 Vol 300:351)。40kDa-OMP とヘミンの結合を阻害する抗体は、*P. gingivalis* の生長や増殖を阻害し本菌に強い傷害を与える可能性が高いと考えられる。

発明の開示

本発明は、歯周病病原菌として知られる *P. gingivalis* を歯周ポケット内から排除しながらも人体に安全と考えられる抗歯周病剤を提供することを目的とする。とくに本発明は、上記歯周病病原菌の凝集阻害活性と白血球による殺菌促進活性とを併せ持ち、好ましくは、ヘミンの結合を阻害する 40-kDa OMP に対するモノクローナル抗体であって、さらに、マウス等の非ヒト動物の抗体と比較して副作用を生じる可能性が低いヒト

モノクローナル抗体を提供することを目的とする。

本発明は、上記従来課題を解決することを目的とするものである。すなわち、本発明者は、歯周病病原菌として知られる *P. gingivalis* を歯周ポケット内から排除しながらも人体に安全と考えられる抗歯周病剤の開発を目的とし鋭意検討を行い、歯周病病原菌の凝集阻害活性と白血球による殺菌促進活性とを併せ持ち、好ましくは、ヘミンの結合を阻害する 40-kDa OMP に対するモノクローナル抗体であって、さらにマウス等の非ヒト動物の抗体と比較して副作用を生じる可能性が低いヒトモノクローナル抗体が抗歯周病剤として優れた効果を有することを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

- [1] ヘミンと 40-kDa OMP との結合阻害活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片、
- [2] (1) *P. gingivalis* 共凝集阻害活性、および (2) ヒト好中球貪食賦活活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片、
- [3] (1) *P. gingivalis* 共凝集阻害活性、および (2) ヘミンと 40-kDa OMP との結合阻害活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片、
- [4] (1) ヒト好中球貪食賦活活性、および (2) ヘミンと 40-kDa OMP との結合阻害活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片、
- [5] (1) *P. gingivalis* 共凝集阻害活性、および (2) ヒト好中球貪食賦活活性、および (3) ヘミンと 40-kDa OMP との結合阻害活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片、
- [6] *P. gingivalis* 共凝集が、*P. gingivalis* と *Actinomyces viscosus* の共凝集である、[2]、[3]および[5]のいずれかの抗体またはその機能的断片、
- [7] 歯槽骨の吸収抑制活性を有する、40-KDaOMP と結合する抗体また

はその機能的断片、

[8] 抗体がヒト抗体である[1]～[7]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[9] マウス-マウスハイブリドーマにより産生される[1]～[8]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[10] 抗体がモノクローナル抗体である、[1]から[9]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[11] 治療薬剤と共有的または非共有的に結合した、[1]～[10]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[12] 治療薬剤が抗生物質または抗菌剤から選択される、[11]の抗体またはその機能的断片、

[13] 抗生物質または抗菌剤がテトラサイクリンまたはミノサイクリンから選択される[12]の抗体またはその機能的断片、

[14] 抗体のクラスが IgG である[1]～[13]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[15] IgG が IgG1 である[14]の抗体またはその機能的断片、

[16] 抗体のクラスが IgA である[1]～[13]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[17] 重鎖定常領域のアミノ酸配列を改変した、[1]～[16]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[18] ハイブリドーマ h13-17（受託番号 FERM BP-8325）が産生する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片、

[19] ハイブリドーマ h13-17（受託番号 FERM BP-8325）が産生する抗体の可変領域を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片、

[20] 治療薬剤と共有的または非共有的に結合した、[18]または[19]の抗体またはその機能的断片、

[21] 治療薬剤が抗生物質または抗菌剤から選択される、[20]の抗体

またはその機能的断片、

[2 2] 抗生物質または抗菌剤がテトラサイクリンまたはミノサイクリンから選択される[2 1]の抗体またはその機能的断片、

[2 3] 抗体のクラスが IgG である[2 8]～[2 2]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[2 4] IgG が IgG1 である[2 3]の抗体又はその機能的断片、

[2 5] 抗体のクラスが IgA である[2 8]～[2 2]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[2 6] 重鎖定常領域のアミノ酸配列を改変した、[2 8]～[2 5]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[2 7] ハイブリドーマ h13-17 (受託番号 FERM BP-8325)、

[2 8] ハイブリドーマ 5-89-2 (受託番号 FERM BP-8323) が産生する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片、

[2 9] ハイブリドーマ 5-89-2 (受託番号 FERM BP-8323) が産生する抗体の可変領域を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片、

[3 0] 治療薬剤と共有的または非共有的に結合した、[2 8]または[2 9]の抗体またはその機能的断片、

[3 1] 治療薬剤が抗生物質または抗菌剤から選択される、[3 0]の抗体またはその機能的断片、

[3 2] 抗生物質または抗菌剤がテトラサイクリンまたはミノサイクリンから選択される[3 1]の抗体またはその機能的断片、

[3 3] 抗体のクラスが IgG である[2 8]～[3 2]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[3 4] IgG が IgG1 である[3 3]の抗体又はその機能的断片、

[3 5] 抗体のクラスが IgA である[2 8]～[3 2]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[3 6] 重鎖定常領域のアミノ酸配列を改変した、[2 8]～[3 5]のい

れかの抗体またはその機能的断片、

[37] ハイブリドーマ 5-89-2 (受託番号 FERM BP-8323)、

[38] ハイブリドーマ a44-1 (受託番号 FERM BP-8324) が産生する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片、

[39] ハイブリドーマ a44-1 (受託番号 FERM BP-8324) が産生する抗体の可変領域を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片、

[40] 治療薬剤と共有的または非共有的に結合した、[38]または[39]の抗体またはその機能的断片、

[41] 治療薬剤が抗生物質または抗菌剤から選択される、[40]の抗体またはその機能的断片、

[42] 抗生物質または抗菌剤がテトラサイクリンまたはミノサイクリンから選択される[41]の抗体またはその機能的断片、

[43] 抗体のクラスが IgG である[38]～[42]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[44] IgG が IgG1 である[43]の抗体又はその機能的断片、

[45] 抗体のクラスが IgA である[38]～[42]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[46] 重鎖定常領域のアミノ酸配列を改変した、[38]～[45]のいずれかの抗体またはその機能的断片、

[47] ハイブリドーマ a44-1 (受託番号 FERM BP-8324)、

[48] ハイブリドーマ h13-17 (受託番号 FERM BP-8325)、ハイブリドーマ 5-89-2 (受託番号 FERM BP-8323) およびハイブリドーマ a44-1 (受託番号 FERM BP-8324) からなる群から選択されるハイブリドーマの保有する核酸であって、前記ハイブリドーマが産生する抗体の可変領域を含む抗体をコードする核酸または該抗体の機能的断片をコードする核酸、

[49] [48]の核酸によりコードされる、抗体またはその機能的断片である蛋白質、

[50] [48]の核酸を有する発現ベクター、

- [5 1] [5 0]の発現ベクターを有する宿主、
- [5 2] 大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞および植物細胞並びに哺乳動物からなる群から選ばれる[5 1]の宿主、
- [5 3] ハイブリドーマ h13-17 (受託番号 FERM BP-8325)、ハイブリドーマ 5-89-2 (受託番号 FERM BP-8323) およびハイブリドーマ a44-1 (受託番号 FERM BP-8324) からなる群から選択されるハイブリドーマから 40-kDa OMP と結合する抗体をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を有する発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主に導入して該抗体を発現せしめ、得られる宿主、宿主の培養上清または宿主の分泌物から該抗体を採取することを含む、40-kDa OMP と結合する抗体の製造方法、
- [5 4] 40-KDaOMP と結合する抗体またはその機能的断片を有効成分として含有する、歯槽骨の吸収抑制剤、
- [5 5] 抗 40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片を有効成分として含有する、歯周病の予防、診断または治療剤、
- [5 6] 40-KDaOMP と結合する抗体またはその機能的断片の歯槽骨の吸収抑制剤の製造のための使用、
- [5 7] 40-KDaOMP と結合する抗体またはその機能的断片を調製し、動物に投与することを含む、歯槽骨の吸収抑制方法、
- [5 8] 40-KDaOMP と結合する抗体またはその機能的断片の歯周病の予防、診断または治療剤の製造のための使用、
- [5 9] 40-KDaOMP と結合する抗体またはその機能的断片を調製し、動物に投与することを含む、歯周病を診断、予防または治療する方法、
- [6 0] [1]～[2 6]、[2 8]～[3 6]、[3 8]～[4 6]および[4 9]のいずれかの抗体またはその機能的断片を有効成分として含有する、歯周病の予防、診断または治療剤、
- [6 1] [1]～[2 6]、[2 8]～[3 6]、[3 8]～[4 6]および[4 9]のいずれかの抗体またはその機能的断片を有効成分として含有する、歯槽骨の吸収抑制剤、

[6 2] [1]～[2 6]、[2 8]～[3 6]、[3 8]～[4 6]および[4 9]のいずれかの抗体またはその機能的断片の歯周病の予防、診断または治療剤の製造のための使用、

[6 3] [1]～[2 6]、[2 8]～[3 6]、[3 8]～[4 6]および[4 9]のいずれかの抗体またはその機能的断片の歯槽骨の吸収抑制剤の製造のための使用、

[6 4] [1]～[2 6]、[2 8]～[3 6]、[3 8]～[4 6]および[4 9]のいずれかの抗体またはその機能的断片を調製し、動物に投与することを含む、歯周病を診断、予防または治療する方法、ならびに

[6 5] [1]～[2 6]、[2 8]～[3 6]、[3 8]～[4 6]および[4 9]のいずれかの抗体またはその機能的断片を調製し、動物に投与することを含む、歯槽骨の吸収抑制方法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2003-072714 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、各抗 40kDa-OMP 抗体の r40kDa-OMP および *P. gingivalis* に対する反応性を示す図である。

図 2 は、各抗 40kDa-OMP 抗体と歯周病患者血清の *P. gingivalis* に対する結合活性の比較を示す図である。

図 3 は、各抗 40kDa-OMP 抗体と *P. gingivalis* の反応解析結果を示す図である。

図 4 は、40kDa-OMP とヘミン相互作用に各抗 40kDa-OMP 抗体が及ぼす影響を示す図である。

図 5 は、h13-17 抗体の 40kDa-OMP とヘミン結合阻害活性を示す図である。

図 6 は、各種 *P. gingivalis* 株への各抗 40kDa-OMP 抗体の反応性を示す図である。

図 7 は、各抗 40kDa-OMP 抗体のラット歯槽骨吸収抑制活性を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

40-kDa OMP は、公知の塩基配列（日本 DNA データバンク：アクセッション番号 AB059658）又はアミノ酸配列に基づいて、遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような技術的分野において知られる方法を適宜用いることにより製造することができる。40-kDa OMP の塩基配列を配列番号 1 に、アミノ酸配列を配列番号 2 に示す。また 40-kDa OMP の部分配列は、後述する技術的分野において知られる方法に従って、遺伝子組換え技術又は化学的合成法により製造することもできるし、また 40-kDa OMP をタンパク分解酵素等を用いて適切に切断することにより製造することができる。

本発明の抗体またはその機能的断片には、以下のような反応性を有する各種の抗 40-kDa OMP モノクローナル抗体またはその機能的断片が包含される。すなわち、① *P. gingivalis* 共凝集阻害活性およびヒト好中球貪食賦活活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体もしくはその機能的断片、② *P. gingivalis* 共凝集阻害活性、ヒト好中球貪食賦活活性およびヘミンと 40-kDa OMP との結合阻害活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体もしくはその機能的断片、③ ヒト好中球貪食賦活活性およびヘミンと 40-kDa OMP との結合阻害活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体もしくはその機能的断片、④ *P. gingivalis* 共凝集阻害活性およびヘミンと 40-kDa OMP との結合阻害活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体もしくはその機能的断片、または⑤ ヘミンと 40-kDa OMP との結合阻害活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体もしくはその機能的断片、が包含される。

ここで *P. gingivalis* の共凝集とは、*P. gingivalis* が *Actinomyces*

viscosus や Streptococcus gordonii 等の他の微生物と凝集することをいい、この凝集により歯周ポケットに病原菌がプラークとして定着する。従って、本発明の抗体の *P. gingivalis* の凝集阻害活性とは、*P. gingivalis* と他の菌との凝集を阻害し得る活性をいう。抗体がこのような凝集阻害活性を有しているか否かは、本明細書の実施例 9 に記載の方法により決定することができる。実施例 9 に記載の方法により凝集阻害活性を測定した場合、本発明の抗体のスコアは好ましくは 2 以下である。また、本発明の抗体の白血球による殺菌促進活性とは、好中球等の白血球の *P. gingivalis* 貪食の賦活化活性をいい、本明細書の実施例 10 に記載の方法により決定することができる。実施例 10 に記載の方法で貪食賦活化活性を測定した場合、本発明の抗体の貪食率はコントロール抗体に比べ有意に高い。さらに、本発明の抗体には、*P. gingivalis* の 40kDa-OMP とヘミンとの結合を阻害する活性を有する抗体が包含される。抗体が *P. gingivalis* の 40kDa-OMP とヘミンとの結合を阻害するか否かは、本明細書の実施例 14 に記載の方法により決定することができる。実施例 14 に記載の方法によりヘミン結合阻害活性を測定した場合、本発明の抗体の活性はコントロール抗体に比べて有意に高い。本発明の抗体の活性の検定に *P. gingivalis* を用いるが、*P. gingivalis* は 40-kDa OMP を発現するものであればいずれでもよく、例えば本発明の実施例で用いた *P. gingivalis* 381 あるいは *P. gingivalis* W50 (ATCC 番号: 53978) が挙げられる。

該抗体またはその機能的断片の例には、後に記載されるような抗 40-kDa OMP モノクローナル抗体、あるいは、該抗体を構成する重鎖及び／又は軽鎖の各々のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する重鎖及び／又は軽鎖からなるモノクローナル抗体であって、上記①から⑤のいずれかの反応性を有する抗体も包含される。前記のようなアミノ酸の「改変」(欠失、置換、挿入、付加)は、そのアミノ酸配列をコードする塩基配列を部分

的に改変することにより導入することができる。例えばこの塩基配列の部分的改変は、既知の部位特異的変異導入法 (Site specific mutagenesis) を用いて常法により導入することができる (Proc Natl Acad Sci USA., 1984 81:5662 ; Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual (1989) Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。例えば、本発明において重鎖定常領域のアミノ酸配列を改変した抗体は、改変前の抗体に比べて、Fc レセプターに対する親和性向上による、より強力な白血球による *P. gingivalis* 貪食賦活化活性を有する可能性がある。

本発明の「抗体」には、いずれのイムノグロブリンクラス及びサブクラスを有する抗体も包含するが、好ましくはヒトイムノグロブリンクラス及びサブクラスを有する抗体であり、好ましいクラス、サブクラスはイムノグロブリン G (IgG) あるいは IgA、特に IgG1 及び IgA である。

本発明の抗体又はその断片の好ましい別の例は、40-kDa OMP のアミノ酸配列中のエピトープを認識し、かつ、上記①から⑤のいずれかの反応性を有するモノクローナル抗体又はその断片からなる配列である。

本発明における抗体の断片とは、前記で定義した抗体の一部を意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、disulphide-linked FV 、Single-Chain FV (sc FV) 及びこれらの重合体等が挙げられる (D. J. King., Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies., 1998 T. J. International Ltd)。このような抗体断片は慣用法、例えばパパイン、ペプシン等のプロテアーゼによる抗体分子の消化、あるいは公知の遺伝子工学的手法により得ることができる。「機能的断片」とは、完全抗体が特異的に結合する抗原に対して、特異的に結合する抗体の断片を意味する。

本発明の抗体は、例えば、下記のような方法によって製造することができる。即ち、例えば、前記で定義したような 40-kDa OMP 若しくはその一部、又は抗原の抗原性を高めるための適当な物質 (例えば、bovine

serum albumin 等) との結合物、又は 40-kDa OMP を細胞表面に多量に発現している細胞を、必要に応じて免疫賦活剤 (Freund's Adjuvant 等) とともに、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ等の非ヒト哺乳動物に免疫する。あるいは、40-kDa OMP を組み込んだ発現ベクターを非ヒト哺乳動物に投与することにより免疫感作を行うことができる。モノクローナル抗体は、免疫感作動物から得た抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞 (ミエローマ細胞) からハイブリドーマを調製し、ハイブリドーマをクローン化し、免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。また好ましくは、再配列されていないヒト抗体遺伝子を保持し、免疫感作により当該免疫原に特異的なヒト抗体を産生する非ヒト動物を免疫に用いることにより、本発明の抗体をヒト抗体として得ることができる。該非ヒト動物としてマウスが挙げられ、ヒト抗体を産生し得るマウスの作成方法は、国際公開 W002/43478 に記載されている。ここで、ヒト抗体とは、ヒト由来の抗体遺伝子の発現産物である抗体、又はその機能的な断片を意味する。本発明のモノクローナル抗体として、例えば独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) にブダペスト条約の規定下で 2003 年 3 月 11 日付で国際寄託したハイブリドーマクローン h13-17 (受託番号 FERM BP-8325)、5-89-2 (FERM BP-8323) 及び a44-1 (FERM BP-8324) が産生するモノクローナル抗体またはその機能的断片が挙げられる。また、これらのモノクローナル抗体のクラスまたはサブクラスを改変させた抗体も含まれる。さらに、これらのハイブリドーマの産生する抗体の重鎖定常領域のアミノ酸配列を改変した抗体またはその機能的断片も含まれる。

本発明は上記ハイブリドーマが有する核酸であって、該ハイブリドーマが産生する抗体の可変領域を含む抗体をコードする核酸または該抗体の機能的断片をコードする核酸も包含し、これらの核酸はハイブリドーマから通常の遺伝子工学的手法により得ることができ、またその塩基配

列も公知の塩基配列決定法により決定することができる。さらに、本発明は前記のようにして得られる核酸がコードするタンパク質も含み、該タンパク質は上記①から⑤のいずれかの反応性をもつ。さらに、本発明は前記核酸を含む発現ベクター、該発現ベクターを含む宿主細胞も包含する。ベクター、及び宿主細胞は限定されず、宿主として例えば大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞のみならず昆虫個体、哺乳動物個体も含まれる。昆虫個体としては例えばカイコが挙げられ、哺乳動物個体としては例えば、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ等が挙げられるが、これらには限定されない。発現ベクターとしては、それぞれの宿主に対応した公知のベクター、市販のベクターを用いることができる。また、発現ベクターを用いての昆虫個体または哺乳動物個体のトランスフェクションも公知の方法により行うことができる。本発明は、さらに前記本発明の核酸を含む発現ベクターを含む宿主細胞または宿主個体において前記核酸を発現させ発現産物を宿主細胞の培養液または宿主個体の体液または乳汁等の分泌物から抗体またはその機能的断片を採取することを含む本発明の抗体またはその機能的断片の製造法をも包含する。

本発明の抗体またはその機能的断片は、具体的には下記のようにして製造することができる。モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（Nature., 1975 Vol. 256:495-497）及びそれに準じて行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄又は扁桃等、好ましくはリンパ節又は脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ又はヒト等の哺乳動物に由来する自己抗体産生能のないミエローマ細胞とを、細胞融合させることにより調製される。細胞融合は例えば、ポリエチレングリコール（例えば分子量 1500～6000）等の高濃度ポリマー溶液中、通常約 30～40℃、約 1～10 分間、抗体産生細胞とミエローマ細胞を混合することによって

行うことができる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェル中の培養上清の免疫抗原に対する反応性を、例えばE L I S A等の酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ、蛍光抗体法などの免疫学的方法を用いて測定することにより行なうことができる。

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロで培養して培養上清から単離することにより行うことができる。また、マウス、ラット、モルモット、ハムスター又はウサギ等の腹水中等でインビボで培養し、腹水から単離することもできる。

また、ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主（例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞等の哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞など）に導入し、遺伝子組換え技術を用いて組換え抗体を調製することができる（P. J. Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, J. W. Goding., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS）。さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニックなウシ、ヤギ、ヒツジ又はブタを作製し、そのトランスジェニック動物のミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である。ハイブリドーマをインビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地又は既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

産生されたモノクローナル抗体は、当該分野において周知の方法、例えばプロテイン A あるいはプロテイン G カラムによるクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、硫酸塩析法、ゲル濾過、アフィニティクロマトグラフィー等を適宜組み合わせることにより精製することができる。

上記の方法で作製された本発明のモノクローナル抗体又はその断片は、治療用薬剤とコンジュゲートすることによって、ミサイル療法等の治療目的に使用可能な複合体を形成できる。抗体へ結合させる治療用薬剤の例としては、以下のものに限定されないが、テトラサイクリン、ミノサイクリン等の抗生物質や抗菌剤等が挙げられる。抗体と治療用薬剤の結合は共有又は非共有結合（例えばイオン結合）のいずれでもよい。例えば、抗体分子中の反応性基（例えばアミノ基、カルボキシル基、水酸基等）又は配位性基を利用し、該反応性基と反応しうる官能基（細菌毒素、化学療法剤の場合）又は該配位性基との間で錯体を形成しうるイオン性基（放射性核種の場合）をもつ治療用薬剤と抗体とを接触させることによって、本発明の複合体を得ることができる。あるいは複合体の形成に際してビオチン-アビジン系の利用も可能であろう。また、治療用薬剤がタンパク質又はペプチドである場合は、遺伝子工学的手法により抗体と前記タンパク質又はペプチドとの融合タンパク質として生産することも可能である。

また、本発明の抗 40-kDa OMP 抗体、あるいは上記治療用薬剤と結合した抗 40-kDa OMP 抗体を含有する歯周病の予防用、診断用または治療用医薬組成物もまた本発明の範囲内に含まれる。本発明の抗 40-kDa OMP 抗体の投与により口腔から *P. gingivalis* を排除することができ、*P. gingivalis* による歯周組織の破壊を防止し、歯周病を予防、治療することができる。該組成物には治療上有効量の治療用薬剤が含まれているべきであり、経口、非経口投与用の種々の形態に製剤化される。ここで、治療上有効量とは、所与の症状や投与計画について治療効果を与える量

をいう。本発明の組成物は、抗体に加えて、生理学的に許容され得る製剤上の添加物、例えば希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント、酸化防止剤、等張化剤、賦形剤及び担体のうち 1 種又は複数を含むことができる。また、他の抗体又は抗生物質のような他の薬剤との混合物とすることもできる。適切な担体には、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、及び緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。さらに当該分野において周知であるアミノ酸、糖類、界面活性剤等の安定化剤、表面への吸着防止剤を含んでいてもよい。製剤の形態としては、ペースト、液体、凍結乾燥製剤（この場合上記のような緩衝水溶液を添加することにより再構成して使用可能である。）、徐放製剤、腸溶性製剤、注射剤又は点滴剤などを含む製剤を、治療目的、治療計画に応じて選択可能である。

投与経路は、経口経路、並びに静脈内、筋肉内、皮下及び腹腔内の注射又は配薬を含む非経腸的経路が考えられるが、動物を用いた試験により最適の経路が選択される。あるいは、患者の患部に直接本発明の組成物を接触させる方法も可能であろう。また直接歯周病患部への適用を考慮すると、口腔内あるいは歯周ポケットへの投与も好ましい。投与量は、動物を用いた試験、臨床試験の実施により適宜決定されるが、一般に患者の状態若しくは重篤度、年齢、体重、性別などが考慮されるべきである。

また、本発明の抗体またはその機能的断片を歯磨き用ペースト、口腔内洗浄剤に混合させて歯周病患部に適用してもよいし、また食品、飲料等に混合した機能性食品の形態で適用することもできる。

さらに、本発明の抗体またはその機能的断片を歯周病の診断剤としても使用することができる。例えば、本発明の抗体またはその機能的断片を用いて歯周ポケットに *P. gingivalis* が存在するか否かを検出することができる。該検出は、歯周ポケットのプラークを採取し、該プラーク中の *P. gingivalis* の存在を、EIA、RIA、免疫凝集法との公知の免疫測定法により検出することにより行うことができる。

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明がその実施例に記載される態様のみに限定されるものではない。

(実施例 1) 組換え体 40-kDa OMP (r40-kDa OMP) の調製

組換え体 40-kDa OMP (r40-kDa OMP) は以下のように調製した。完全長 r40-kDa OMP DNA (日本 DNA データバンク: アクセス番号 AB059658) をベクター組み込んだ組み換えプラスミド pMD125 をもつ大腸菌 (*Escherichia coli* K-12) を、テトラサイクリン $10 \mu\text{g/mL}$ を含む LB 培地 (1% tryptone (ベクトン・ディッキンソン社製), 0.5% yeast extract (ベクトン・ディッキンソン社製), 0.5% NaCl) で培養した。菌体を遠心機にて回収後、超音波処理により菌体を破壊した。遠心分離機を用いて菌体破壊上清を得た後、Kawamoto ら (Int. J. Biochem. 1991 Vol 23:1053) の方法に従い r40-kDa OMP を精製した。調製された r40-kDa OMP は透析膜 (分子量 10000 以下カット, Spectrum Laboratories 社製) を用いて PBS (-) に置換し、SDS/PAGE 電気泳動で分子量 40,000 の単一バンドの精製タンパクを得た。

(実施例 2) ヒト抗体産生マウスの作製

免疫に用いたマウスは、内因性 Ig 重鎖破壊及び κ 軽鎖破壊の両者についてホモ接合体の遺伝的背景を有しており、かつヒト Ig 重鎖遺伝子座を含む 14 番染色体断片 (SC20) 及びヒト Ig κ 鎖トランスジーン (KCo5) を同時に保持する。このマウスは、ヒト Ig 重鎖遺伝子座を持つ系統 (系統 A) のマウスと、ヒト Ig κ 鎖トランスジーンを持つ系統 (系統 B) のマウスとの交配により作製した。系統 A は、内因性 Ig 重鎖及び κ 軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、子孫伝達可能な 14 番染色体断片 (SC20) を保持するマウス系統であり、例えば富塚らの報告 (Tomizuka. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2000 Vol 97:722) に記載されている。また、系統 B は、内因性 Ig 重鎖及び κ 軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、ヒト Ig κ 鎖トランスジーン (KCo5) を保持するマウス系統であり、例えば Fishwild らの報告 (Nat. Biotechnol., 1996 Vol

14:845)に記載されている。系統 A の雄マウスと系統 B の雌マウス、あるいは系統 A の雌マウスと系統 B の雄マウスの交配により得られた、血清中にヒト Ig 重鎖及び κ 軽鎖が同時に検出される固体 (Ishida & Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering, Abstract 2000) を以下の免疫実験に用いた。なお、前記ヒト抗体産生マウスは、契約を結ぶことによって、麒麟麦酒株式会社より入手可能である。

(実施例 3) 40-kDa OMP に対するヒトモノクローナル抗体の調製

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、単クローン抗体実験操作入門 (安東民衛ら著作、講談社発行 1991) 等に記載されるような一般的方法に従って調製した。免疫原としての 40-kDa OMP は、実施例 1 で調製した r40-kDa OMP を用いた。被免疫動物は、実施例 2 で作製したヒト免疫グロブリンを産生するヒト抗体産生マウスを用いた。

ヒト抗体産生マウスに、実施例 1 で作製した r40-kDa OMP を RIBI アジュバンド (Corixa 社製) と混合し、 $20\mu\text{g}$ の r40-kDa OMP を腹腔内投与することにより初回免疫した。r40-kDa OMP と RIBI アジュバンド混液を初回免疫から 1 週間～2 週間毎に腹腔内投与により 4 回追加免疫した。さらに、以下に述べる脾臓細胞の取得 3 日前に r40-kDa OMP を尾静脈内注射により追加免疫した。

免疫されたマウスから脾臓を外科的に取得し、回収した脾臓細胞をマウスミエローマ SP2/0 (ATCC No.: CRL1581) と 5 : 1 で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール 1500 (Boehringer Mannheim 社製) を用いて細胞融合させることにより多数のハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの選択は、10% のウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum、FCS) とヒポキサンチン (H)、アミノプテリン (A)、チミジン (T) を含有する HAT 含有 DMEM 培地 (Gibco BRL 社製) 中で培養することにより行った。さらに、HT 含有 DMEM 培地を用いて限界希釈法によりシングルクローンにした。培養は、96-well マイクロタイタープレート (ベクトンディッキンソン社製) 中で行った。抗 r40-kDa OMP ヒトモノクローナル抗体を

產生するハイブリドーマクローンの選択（スクリーニング）及び各々のハイブリドーマが產生するヒトモノクローナル抗体の特徴付けは、後述する酵素標識免疫吸着アッセイ (ELISA) 及び蛍光活性化セルソーター (FACS) により測定することにより行った。

ヒトモノクローナル抗体產生ハイブリドーマの ELISA によるスクリーニングは、以下に述べる Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA) および Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) により、ヒト免疫グロブリン γ 鎖 (hIg γ) 及びヒト免疫グロブリン軽鎖 κ を有し、かつ、r40-kDa OMP に特異的な反応性を有するヒトモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを得た。なお、本実施例を含め以下のいずれの実施例中、並びに実施例における試験結果として示した表又は図中においては、各々の本発明のヒト抗 40-kDa OMP モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマクローンは記号を用いて命名した。以下のハイブリドーマクローンはシングルクローンを表わす：h13-17, 5-89-2, a44-1 又は 1-85-16。それらの内 3 つのハイブリドーマクローン h13-17, 5-89-2 及び a44-1 を、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）にブダペスト条約の規定下で国際寄託した。ハイブリドーマクローン h13-17, 5-89-2 及び a44-1 は各々受託番号 FERM BP-8325、FERM BP-8323 及び BP-8324 である（2003 年 3 月 11 日付）。

（実施例 4）ヒト免疫グロブリン γ 鎖を有するモノクローナル抗体の検出

実施例 1 で作製した r40-kDa OMP ($1\mu\text{g/ml}$ $50\text{mMNa}_2\text{HCO}_3$) を、ELISA 用 96 穴マイクロプレート (Maxisorp、Nunc 社製) の各ウェルに $50\mu\text{l}$ 加え、室温で 30 分インキュベートし、r40-kDa OMP をマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルにブロッキング試薬 (SuperBlockTM Blocking Buffer, PIERCE 社製) を加え室温で 10 分間インキュベートし、r40-kDa OMP が結合していない部位をブロックした。

このようにして、各ウェルを r40-kDa OMP でコーティングしたマイクロプレートを作製した。また、*P. gingivalis* 381 株を嫌氣的に $5\mu\text{g/mL}$ ヘミン (Sigma 社製)、 $0.5\mu\text{g/mL}$ ビタミン K、0.5% yeast extract (Difco 社製) 添加 Trypticase soy broth (BBL 社製) 中にて 37°C で培養し、中期対数期まで *P. gingivalis* を増殖させた。その後、遠心分離 ($10,000 \times g$, 10 分, 4°C) によって同細菌の細胞を回収し、 60°C 、30 分で熱処理した。次に PBS 中に再懸濁させ、超音波ホモジナイザー (Branson Sonifier 250) を使用し、氷上で 15 分音波処理をした。この超音波処理物を遠心分離 ($100,000 \times g$, 30 分, 4°C) し、上清を濾過 ($0.22\mu\text{m}$) した。超音波処理物の濃度は 280nm の吸光度を測定し、 1mg/mL を 1.0 Optical density (O.D.) として算出した。*P. gingivalis* 超音波処理物 ($50\mu\text{g/mL}$ $50\text{mMNa}_2\text{HCO}_3$, $50\mu\text{l}$ /ウェル) を、ELISA 用 96 穴マイクロプレート (Maxisorp、Nunc 社製) の各ウェルに加え、室温で 30 分インキュベートし、*P. gingivalis* 超音波処理物をマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルにブロッキング試薬 (SuperBlockTM Blocking Buffer, PIERCE 社製) を加え室温で 10 分間インキュベートした。各ウェルを、0.1% Tween20 含有リン酸緩衝液 (PBS-T) で 2 回洗浄した。r40-kDa OMP あるいは *P. gingivalis* 超音波処理物をコーティングしたマイクロプレートの各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清 $50\mu\text{l}$ を加え、室温下で 30 分反応させた後、各ウェルを、PBS-T で 2 回洗浄した。次いで、過酸化酵素で標識されたヤギ抗ヒト IgG F(ab')² 抗体 (Biosource International 社製) を 10% ブロックエース (大日本製薬株式会社製) 含有 PBS-T で 2,000 倍に希釈した溶液 $50\mu\text{l}$ を、各ウェルに加え、室温下 30 分インキュベートした。マイクロプレートを、PBS-T で 3 回洗浄後、発色基質液 (TMB、DAKO 社製) を各ウェルに $100\mu\text{l}$ 加え、室温下で 20 分間インキュベートした。各ウェルに 2M 硫酸 $50\mu\text{l}$ を加え反応を止めた。波長 450nm (参照波長 570nm) での吸光度をマイクロプレートリーダー (MTP-300, コロナ電気社製) で測定した。その結果、300 クローン以上

の抗 r40-kDa OMP 抗体が取得できた。その一部を図 1 に示す。

(実施例 5) ヒト免疫グロブリン軽鎖 κ (IgL κ) を有するモノクローナル抗体の検出

実施例 1 で作製した r40-kDa OMP ($1\mu\text{g/ml}$ $50\text{mMNa}_2\text{HCO}_3$) を、ELISA 用 96 穴マイクロプレート (Maxisorp、Nunc 社製) の各ウェルに $50\mu\text{l}$ 加え、室温で 30 分インキュベートし、r40-kDa OMP をマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て各ウェルにブロッキング試薬 (SuperBlockTM Blocking Buffer, PIERCE 社製) を加え室温で 10 分間インキュベートした。各ウェルを、PBS-T で 2 回洗浄した。r40-kDa OMP をコーティングしたマイクロプレートの各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清 $50\mu\text{l}$ を加え 30 分反応させた後、各ウェルを PBS-T で 2 回洗浄した。次いで各ウェルに過酸化酵素で標識したヤギ抗ヒト Ig κ 抗体 (2,000 倍希釈、Biosource International 社製) を $50\mu\text{l}$ 加え、室温下で 30 分間インキュベートした。PBS-T で 3 回洗浄後、基質緩衝液 (TMB、DAKO 社製) を各ウェルに $100\mu\text{l}$ 加え、室温下で 20 分間インキュベートした。次いで、2M 硫酸 $50\mu\text{l}$ を各ウェルに加え、反応を止めた。波長 450nm (参照波長 570nm) での吸光度をマイクロプレートリーダー (MTP-300, コロナ電気社製) で測定した。

(実施例 6) 各モノクローナル抗体のサブクラス同定

実施例 1 で作製した r40-kDa OMP ($1\mu\text{g/ml}$ $50\text{mMNa}_2\text{HCO}_3$) を ELISA 用 96 穴マイクロプレート (Maxisorp、Nunc 社製) の各ウェルに $50\mu\text{l}$ 加え、室温で 30 分インキュベートし r40-kDa OMP をマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て各ウェルにブロッキング試薬 (SuperBlockTM Blocking Buffer, PIERCE 社製) を加え室温で 10 分間インキュベートした。各ウェルを、PBS-T で 2 回洗浄した。r40-kDa OMP をコーティングしたマイクロプレートの各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清 $50\mu\text{l}$ を加え 30 分反応させた後、各ウェルを PBS-T で 2 回洗浄した。次いで、各ウェルにそれぞれ過酸化酵素で標識したヒツジ抗ヒト IgG1 抗体、

ヒツジ抗ヒト IgG2 抗体、ヒツジ抗ヒト IgG3 抗体又はヒツジ抗ヒト IgG4 抗体（各 2,000 倍希釈、The Binding Site 社製）を $50\mu\text{l}$ 加え、室温下で 30 分間インキュベートした。PBS-T で 3 回洗浄後、基質緩衝液（TMB、DAKO 社製）を各ウェルに $100\mu\text{l}$ 加え、室温下で 20 分間インキュベートした。次いで 2M 硫酸 $50\mu\text{l}$ を各ウェルに加え反応を止めた。波長 450nm（参照波長 570nm）での吸光度をマイクロプレートリーダー（MTP-300、コロナ電気社製）で測定した。

（実施例 7）各抗体の調製

抗 r40-kDa OMP 抗体を含む培養上清の調製は以下の方法にて行った。抗 r40-kDa OMP 抗体産生ハイブリドーマをウシインシュリン（ $5\mu\text{g/ml}$ 、Gibco BRL 社製）、ヒトトランスフェリン（ $5\mu\text{g/ml}$ 、Gibco BRL 社製）、エタノールアミン（ 0.01mM 、シグマ社製）、亜セレン酸ナトリウム（ $2.5 \times 10^{-5}\text{mM}$ 、シグマ社製）含有 eRDF 培地（極東製薬社製）に馴化した。スピナーフラスコにて培養し、ハイブリドーマの生細胞率が 90% になった時点で培養上清を回収した。回収した上清は、 $10\mu\text{m}$ と $0.2\mu\text{m}$ のフィルター（ゲルマンサイエンス社製）に供し、ハイブリドーマ等の雑排物を除去した。

上記培養上清からの抗 r40-kDa OMP 抗体の精製は以下の方法で行った。抗 r40-kDa OMP 抗体を含む培養上清を Hyper D Protein A カラム（日本ガイシ社製）を用い、付属の説明書に従い吸着緩衝液として PBS (-)、溶出緩衝液として 0.1M クエン酸ナトリウム緩衝液（pH 3.5）を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は 1M Tris-HCl（pH 8.0）を添加して pH7.2 付近に調整した。調製された抗体溶液は、透析膜（分子量 10000 カット、Spectrum Laboratories 社製）を用いて PBS (-) に置換し、孔径 $0.22\mu\text{m}$ のメンブランフィルター MILLEX-GV（MILLIPORE 製）でろ過滅菌し、精製抗 r40-kDa OMP 抗体を得た。精製抗体の濃度は 280 nm の吸光度を測定し、 1mg/ml を 1.45 O.D. として算出した。

（実施例 8）アイソタイプコントロール抗体の調製

同様の方法にてヒト抗体産生マウスに DNP-KLH を免疫後、その脾臓細

胞をマウスミエローマ SP2/0 細胞融合させることにより多数のハイブリドーマを作製し、各々の抗ヒト IgG1, IgG2, IgG4 抗体を調製した。

(実施例 9) 抗 r40-kDa OMP 抗体による *P. gingivalis* の共凝集阻害

P. gingivalis の共凝集阻害試験は、Ellen R. P. らの方法 (Infect. Immun. 1989; 57:1618-1620) を改変し実施した。*P. gingivalis* 381 ((1) 〒271-8587 千葉県松戸市栄町西 2-8 7 0-1 日本大学松戸歯学部口腔生化学講座 安孫子宜光教授、または (2) 〒951-8514 新潟市学校町通 2 番町 5274 番地 新潟大学大学院 医歯学総合研究科 摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野 吉江弘正教授から分譲可能) の vesicles (0.7 ng/mL) を Hiratsuka らの方法 (Arch. Oral. Biol. 1982; 37:717-724) に従い調製し、各々の抗体と 37℃、30 分間反応させた。また、*Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*、ATCC19246) を嫌氣的に 5 mg/mL yeast extract (BBL 社製) 添加 37mg/mL Brain heart infusion (BBL 社製) 中、37℃で培養し、PBS で吸光度が 1.5 (波長 500nm) になるよう調製した。調製された *A. viscosus* 50 μ L を等量の PBS で懸濁し、この溶液に各抗体と反応させた *P. gingivalis* 381 の vesicles 50 μ L を添加し、フロキュレーションスライド上で 37℃、10 分間反応させた。反応後、肉眼あるいは光学顕微鏡下で凝集活性を評価した。阻害活性の基準 (スコア 0-4) は Cisar. J. O. らの方法に従った (Infect. Immun., 1979 Vol 33:467)。その結果、13 個の抗 r40-kDa OMP 抗体が *P. gingivalis* 381 の vesicles と *A. viscosus* の共凝集阻害活性を示した。活性のある抗体の中で共凝集阻害活性が強い h13-17, 5-89-2, a44-1 および 1-85-16 を選抜した (表 1)。以下の実験はこれら 4 つの抗体を用い実施した。

表 1

各抗 40kDa-OMP 抗体による *P. gingivalis* の共凝集阻害活性

表 1

クローン	共凝集阻害活性	サブクラス
a44-1	1	IgG1 (κ)
h13-17	1	IgG1 (κ)
1-85-16	1	IgG1 (κ)
5-89-2	2	IgG1 (κ)

抗体濃度 : a44-1 (193 μ g/mL), h13-17 (175 μ g/mL), 1-86-16 (161 μ g/mL), 5-89-2 (32 μ g/mL)

共凝集阻害能の数値は低いほど活性が強い

(実施例 10) 抗 r40-kDa OMP 抗体によるヒト好中球貪食の賦活化

貪食試験は Perticarari S. らの方法 (Cytometry 1991; 12:687-693) を改変し実施した。P. gingivalis 381 株を嫌氣的に $5 \mu\text{g/mL}$ ヘミン、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ ビタミン K、0.5% yeast extract (Difco 社製) 添加 Trypticase soy broth (BBL 社製) 中にて 37°C で培養し、中期対数期まで P. gingivalis を増殖させた。その後、遠心分離 ($10,000 \times g$, 10 分, 4°C) によって同細菌の細胞を回収し、 60°C 、30 分で熱処理し PBS で 2 回洗浄後 2×10^8 cfu/mL に調製した。P. gingivalis 381 懸濁液 1 mL に、0.1M sodium carbonate buffer (pH9.6) で 1 mg/mL に調製された FITC (Molecular Probes 社製) を 1 mL 添加し、 37°C 、30 分培養し、PBS で 3 回洗浄後、FITC 標識 P. gingivalis 381 を 2×10^8 cfu/mL に調製した。FITC 標識 P. gingivalis 381 への抗 r40-kDa OMP 抗体の結合は、標識されていない P. gingivalis 381 と同程度であった。ヒト好中球の分離法については、ヘパリンコート真空採血管によりヒト末梢静脈血を採取後、Histopaque 1077 と 1119 (Sigma 社製) を用いた 2 重密度勾配遠心法にて行った。更に、氷冷した溶血液 (10 mM Tris , 10 mM KCl , 1 mM MgCl_2 , pH7.4) にて残存赤血球を低張溶血し、PBS にて浸透圧を回復後、洗浄し、 2×10^6 /mL に調製した。調製された好中球は直ちに次の貪食試験に供した。

2×10^7 cfu/mL の FITC 標識 P. gingivalis 381 を各々の抗 r40-kDa OMP 抗体あるいはコントロール抗体を ($1 \mu\text{g/mL}$, $5 \mu\text{L}$) を加え、 37°C 、30 分間反応させた。PBS で 2 回洗浄後、再懸濁した。ヒト好中球と FITC 標識 P. gingivalis を 1:20 の割合になるよう混合し、 4°C あるいは 37°C で 30 分間培養した。貪食反応後 10,000 個の好中球を FACScan (Becton Dickinson 社製) で取り込み、FITC の蛍光強度を測定することにより、貪食能を評価した。貪食した好中球の割合 (貪食率) は以下の計算式により求めた。貪食率 (%) = (37°C での FITC 陽性好中球の割合 (%)) - (4°C での FITC 陽性好中球の割合 (%)) その結果、何れの抗体もコントロール抗体と比較した場合、好中球の貪食活性を増強する効果があ

ることが観察された（表 2）。さらに、報告されているマウス 40-kDa OMP 抗体（Pg-ompA3: Sito S. et.al., Gen. Pharmacol, 1997 Vol 28:675）とヒト 40-kDa OMP 抗体（h13-17, 5-89-2, a44-1）と活性を同じ評価系にて比較した。その結果、マウス抗体 Pg-ompA3 はヒト好中球の貪食能を増強する活性は非常に弱く、ヒト抗体が優れていることが示された（図 2）。

表 2

各抗 40kDa-OMP 抗体によるヒト polymorphonuclear neutrophils の
P. gingivalis 貪食賦活化活性

クローン	PMN 貪食率
5-89-2	76.2% *
1-85-16	83.0% *
a44-1	78.6% *
h13-17	81.3% *
Control IgG1	49.8%

* : PMN (Polymorphonuclear neutrophils) 貪食率
がコントロールと比べ有意に高い ($P < 0.05$)

(実施例 1 1) r40-kDa OMP 抗体と患者血清の *P. gingivalis* への結合活性比較

4つの r40-kDa OMP 抗体と慢性歯周病患者血清の *P. gingivalis* への結合の強さを実施例 4 と同法の ELISA にて比較した。r40-kDa OMP あるいは *P. gingivalis* 超音波処理物をコーティングしたマイクロプレートの各ウェルに、各々の抗体 (150ng/mL) あるいは適宜希釈した患者血清由来 IgG 抗体 (Kobayashi, T. et. al., Infect. Immun., 2001 Vol 69:2935) を 50 μ l 加え反応させた。洗浄後、過酸化酵素標識ヤギ抗ヒト IgG F(ab')² 抗体 (免疫生物研究所社製) と発色基質液 (TMB) で結合抗体を検出した。その結果、r40-kDa OMP と同等に結合する濃度で比較すると、全ての抗体が患者血清より、*P. gingivalis* に強い結合活性を有する抗体であることが判明した (図 3)。

(実施例 1 2) 各抗 r40-kDa OMP 抗体のヒト血液細胞交叉反応性

各モノクローナル抗体のヒト血液細胞への交叉反応性を FACS 解析で調べた。1mL ヘパリン (Novo 社製) 入りヒト末梢血 10mL を 10mL の PBS (-) で 2 倍に希釈し、20mL の Ficoll-Paque PLUS 液 (Amersham Pharmacia Biotech 社製) 上に重層した。1500 r.p.m. で 30 分間遠心後単核球画分を回収し、PBS (-) で 2 回洗浄した。調製された細胞は 1% ラット血清入り、0.1% NaN₃、2% FCS 含有 PBS の Staining Buffer (SB) に 2x10⁶/ml の濃度で浮遊させた。細胞浮遊液 (100 μ l/ウェル) を 96-well 丸底プレート (ベクトンディッキンソン社製) に分注した。h13-17, 5-89-2, a44-1 又は 1-85-16 の各々の抗体を 5 μ g/mL の濃度で氷温下 30 分間インキュベートした。SB で 2 回洗浄した後、300 μ l の FACS 緩衝液に懸濁し、FACS (FACScan、ベクトンディッキンソン社製) で各抗体の反応性を調べた。その結果、いずれの抗体もヒト末梢血細胞に結合しなかった。このことから全ての抗体がヒトに投与したときに副作用の生じにくい抗体であることが予想された。

(実施例 1 3) 抗 r40-kDa OMP 抗体の *P. gingivalis* に対する結合活性

各抗体の *P. gingivalis* に対する結合を表面プラズモン共鳴法 (BIACORE、BIACORE 社製) を用いて評価した。センサーチップ (CM5) を実験プロトコールに従い、アミンカップリング法で固定化した (固定化量: cIgG 1=9097RU, a44-1=7355RU, h13-17=7473RU, 5-89-2=7595RU, 1-85-16=7870RU)。60℃で 30 分処理し死滅させた *P. gingivalis* 菌体を 10mM Tris-HCl/150mM NaCl, pH8.0 の緩衝液にて 0. D. 550 nm=0.4 の濃度に調製し、流速 10 μ L/min で供給した。その結果 5-89-2 は他の抗体と比べた場合解離速度が遅く、*P. gingivalis* に強く結合する抗体であることが分かった (図 4)。歯周病の治療の際予想される唾液による抗体排除作用を考慮した場合、5-89-2 のような解離が遅い抗体が良い。このことから 5-89-2 はヒトに投与したときに高い治療効果を示す抗体であることが予想された。

(実施例 1 4) 抗 r40-kDa OMP 抗体の *P. gingivalis* に対するヘミン結合阻害活性

40-kDa OMP に対するヘミンの結合を抗 r40-kDa OMP 抗体が阻害するか表面プラズモン共鳴法 (BIACORE、BIACORE 社製) を用いて評価した。アミンカップリング法で r40-kDa OMP を固定化した (RU=3 5 0 0)。図 5 は、10mM Tris-HCl/150mM NaCl, pH 8.0 (T-B) の緩衝液にて 20 μ g/mL に調製した各抗体を流速 20 μ L/m で供給し、さらに、T-B の緩衝液にて調製した 5 μ g/mL のヘミン (シグマ社製) を供給した結果である。ヘミンの供給が開始された時間を 0 秒としたセンサグラムを示している。h13-17 を r40-kDa OMP に前結合させた場合、ヘミンの結合が cIgG に比べ優位に低下していることが観察された。一方、他の 3 クローンは、前結合させてもコントロールと同程度の r40-kDa OMP とヘミンの結合が観察された。これらの結果より、h13-17 は、ヘミンの r40-kDa OMP に対する結合を阻害することが示唆された。さらに、図 6 は、h13-17 とヘミンを同時に反応させ h13-17 がヘミンと r40-kDa OMP の結合を阻害するかを調べたものである。h13-17 とヘミンを T-B 緩衝液にてそれぞれ 20 μ g/mL

と $5\mu\text{g/mL}$ に調製し、 $r40\text{-kDa OMP}$ 固定化センサーチップに流速 $20\mu\text{L/m}$ で供給した。対象抗体として $h13\text{-}17$ と解離速度がほぼ同じ（図 4 参照）である $a44\text{-}1$ 抗体を用いた。その結果、アナライト拡散後の平衡期に近い時点（380 秒）でのシグナルを見ると、 $h13\text{-}17$ 存在下ではヘミンと $r40\text{-kDa OMP}$ の結合シグナルは 255RU で、 $h13\text{-}17$ 単独のシグナル（252RU）とほぼ同じである。そのシグナルの差（ $255\text{RU}-252\text{RU}=3\text{RU}$ ）は、この時点でのコントロール IgG1 + ヘミンのシグナル（30RU）より明らかに低く、ヘミンは $r40\text{-kDa OMP}$ と結合していない。一方、対象の $a44\text{-}1$ の 380 秒時のシグナルは $a44\text{-}1$ のシグナルとコントロール IgG1 + ヘミンのシグナルの総和が 180RU（ $148\text{RU}+32\text{RU}$ ）で、 $a44\text{-}1$ +ヘミンのシグナルは 170RU と抗体とヘミンが競合しない時の理論値（180RU）に近い値を示した。これらの結果より、 $h13\text{-}17$ はヘミンと OMP40 の結合を強く阻害する抗体であることが示された。

（実施例 15）抗 $r40\text{-kDa OMP}$ 抗体のラット実験歯周炎に対する抑制効果

ラット末梢血よりラット好中球を Lympholite-Rat (sigma 社製) を用い密度勾配遠心法により分離し、実施例 10 と同様に各抗 $r40\text{-kDa OMP}$ 抗体のラット好中球貪食賦活化活性の評価を行ったところ活性が観察された。そこで、*P. gingivalis* をラット口腔に接種することにより歯槽骨の吸収を惹起する実験的歯周炎の系を用いて、試験管内実験において *P. gingivalis* に対して強い結合能、共凝集能阻害活性、好中球貪食賦活化活性を有する抗 $r40\text{-kDa OMP}$ 抗体のラット実験歯周炎に対する抑制効果について検討した。*P. gingivalis* 接種によるラット実験的歯周炎の惹起感染は、生後 3 週齢の Sprague-Dawley 系の SPF ラットを使用し、1 群 6 匹で行なった。健康状態を観察後、イオン交換水中に最終濃度 1mg/mL のサルファメトキサゾールと $200\mu\text{g/mL}$ のトリメトプリムを混合したものを飲料水として 1 週間与えて口腔常在菌を減少させた。その後、3 日間抗生物質を含まないイオン交換水を与え PBS で作製した 5% カルボ

キシメチルセルロース (CMC) 溶液で調製した *P. gingivalis* 株 (ATCC33277) の菌液 (10^9 CFU/ml) を 2 日毎に 3 回、ラット口腔内へ直接投与した。*P. gingivalis* 未接種群 (sham) には 5% CMC 溶液のみを与え、同条件で飼育した。抗体の投与は、a44-1, h13-17, 5-89-2 抗体を各 0.5mg/ml 濃度に調製し、3 抗体を等量ずつ混ぜ合わせ 5% CMC 溶液で希釈した溶液の投与群とコントロールとして PBS で作製した 5% CMC 溶液で 0.5mg/ml に調製した DNP ヒト抗体 (IgG1) 投与群を用いた。投与回数は、*P. gingivalis* の投与開始 2 日前から最終投与 2 日後まで毎日、計 9 回投与した。尚、*P. gingivalis* 接種時においては、菌接種 10 分後に抗体を投与した。すべてのラットは、食事、飲料水を自由に摂取できるようにし、温度 23℃、湿度 60% および明暗 12 時間サイクルの環境下で飼育した。

ラット口腔内の *P. gingivalis* の存在は、PCR 反応を行なって確認した。すなわち、綿棒でラット口腔内を 30 秒間拭って、ブランク細菌を採取し、ISOPLANT (ニッポンジーン社製) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を 20 μ L の $T_{10}E_1$ 溶液にて溶解し保存した。プライマーは、Ashimoto らが報告 (Ashimoto, A. et al., Oral Microbiol Immunol., 1996 Vol 11:266) した 16S rRNA の塩基配列に基づいて作製し、PCR 反応は 95℃ 5 分間加熱変性後、95℃ 30 秒、60℃ 1 分、72℃ 1 分を 35 サイクルで行った。

骨吸収の測定は以下の様に実施した。*P. gingivalis* 接種最終日から 42 日目にすべてのラットをエーテル麻酔下で断頭瀉血により屠殺した。歯槽骨吸収量の評価は、上顎臼歯部のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を 7 箇所測定して行なった。頭蓋骨を 2 気圧下で 10 分間加熱後、3% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸漬して軟組織を除去し、1% メチレンブルー溶液で歯槽骨を染色乾燥させた試料をキーエンス社製デジタル HD マイクロスコープ (実体顕微鏡) で 40 倍の倍率で測定した。7 箇所の測定値を平均して個体当たりの骨吸収量とし、それぞれ 6 匹分の平均値を実験群の骨吸収量としてミリメートルで表示した。測定は、同一試料に

ついて 3 回実施し平均値と標準誤差 (SE) を求めた。統計解析は、Fisher' s PLSD (StatView) にて行った。

その結果 (図 7)、*P. gingivalis* を投与した群は、明らかに非投与群と比較して有意に骨吸収量の増加が認められた ($p < 0.01$)。また、抗 r40-kDa OMP 抗体の投与により有意に骨吸収の抑制が確認され、0.5mg/ml 濃度で使用了群では *P. gingivalis* 非投与群と同程度で、*P. gingivalis* 投与による骨吸収がほとんど認められなかった。コントロール抗体 (DNP 抗体) を投与した群では、*P. gingivalis* のみを投与した群と比較して、多少骨吸収量が減少したが、有意差は認められなかった。以上の結果から、骨吸収を指標とした今回の実験では、OMP40 抗原に対するモノクローナル抗体がラット歯槽骨の吸収を抑制できることが明らかになった。OMP40 抗体の投与により、骨吸収量に明らかな減少が認められたことから、実験終了時における *P. gingivalis* のラット口腔内残存率を PCR で検討の結果、*P. gingivalis* 接種群では、6 匹すべてに *P. gingivalis* の存在が確認されたが、OMP40 抗体を投与した群では、6 匹中 5 匹において *P. gingivalis* の存在が確認されなかった (表 3)。

表 3

表3

PCRによるラット口腔内からの
P. gingivalis の検出

実験群	検出率(%)
SHAM (P.g未接種)	0/6 (0)
Pg+コントロール抗体	5/6 (83.3)
Pg+抗r40-kDaOMP抗体	1/6 (16.7)
Pgのみ	6/6 (100)

以上の結果より、OMP40 モノクローナル抗体は歯周病治療に有効であることが強く示唆された。

産業上の利用可能性

実施例に示すように、本発明の 40-kDa OMP と結合する抗体は *P. gingivalis* の凝集を阻害し、また白血球の貪食能を促進する。さらに、本発明の 40-kDa OMP と結合する抗体は、口腔から *P. gingivalis* を排除することができる。このことより、本発明の抗体またはその機能的断片を歯周病の治療、診断に有効に用いることができる。

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形および変更

が可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

請求の範囲

1. ヘミンと 40-kDa OMP との結合阻害活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片。
2. (1) *P. gingivalis* 共凝集阻害活性、および (2) ヒト好中球貪食賦活活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片。
3. (1) *P. gingivalis* 共凝集阻害活性、および (2) ヘミンと 40-kDa OMP との結合阻害活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片。
4. (1) ヒト好中球貪食賦活活性、および (2) ヘミンと 40-kDa OMP との結合阻害活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片。
5. (1) *P. gingivalis* 共凝集阻害活性、および (2) ヒト好中球貪食賦活活性、および (3) ヘミンと 40-kDa OMP との結合阻害活性を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片。
6. *P. gingivalis* 共凝集が、*P. gingivalis* と *Actinomyces viscosus* の共凝集である、請求項 2、3 および 5 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその機能的断片。
7. 歯槽骨の吸収抑制活性を有する、40-KDaOMP と結合する抗体またはその機能的断片。
8. 抗体がヒト抗体である請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその機能的断片。
9. マウス-マウスハイブリドーマにより産生される請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその機能的断片。
10. 抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその機能的断片。
11. 治療薬剤と共有的または非共有的に結合した、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその機能的断片。
12. 治療薬剤が抗生物質または抗菌剤から選択される、請求項 11

記載の抗体またはその機能的断片。

13. 抗生物質または抗菌剤がテトラサイクリンまたはミノサイクリンから選択される請求項12記載の抗体またはその機能的断片。

14. 抗体のクラスがIgGである請求項1～13のいずれか1項に記載の抗体またはその機能的断片。

15. IgGがIgG1である請求項14記載の抗体またはその機能的断片。

16. 抗体のクラスがIgAである請求項1～13のいずれか1項に記載の抗体またはその機能的断片。

17. 重鎖定常領域のアミノ酸配列を改変した、請求項1～16のいずれか1項に記載の抗体またはその機能的断片。

18. ハイブリドーマh13-17（受託番号FERM BP-8325）が産生する、40-kDa OMPと結合する抗体またはその機能的断片。

19. ハイブリドーマh13-17（受託番号FERM BP-8325）が産生する抗体の可変領域を有する、40-kDa OMPと結合する抗体またはその機能的断片。

20. 治療薬剤と共有的または非共有的に結合した、請求項18または19に記載の抗体またはその機能的断片。

21. 治療薬剤が抗生物質または抗菌剤から選択される、請求項20記載の抗体またはその機能的断片。

22. 抗生物質または抗菌剤がテトラサイクリンまたはミノサイクリンから選択される請求項21記載の抗体またはその機能的断片。

23. 抗体のクラスがIgGである請求項18～22のいずれか1項に記載の抗体またはその機能的断片。

24. IgGがIgG1である請求項23記載の抗体又はその機能的断片。

25. 抗体のクラスがIgAである請求項18～22のいずれか1項に記載の抗体またはその機能的断片。

26. 重鎖定常領域のアミノ酸配列を改変した、請求項18～25のいずれか1項に記載の抗体またはその機能的断片。

27. ハイブリドーマ h13-17 (受託番号 FERM BP-8325)。
28. ハイブリドーマ 5-89-2 (受託番号 FERM BP-8323) が産生する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片。
29. ハイブリドーマ 5-89-2 (受託番号 FERM BP-8323) が産生する抗体の可変領域を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片。
30. 治療薬剤と共有的または非共有的に結合した、請求項 28 または 29 に記載の抗体またはその機能的断片。
31. 治療薬剤が抗生物質または抗菌剤から選択される、請求項 30 に記載の抗体またはその機能的断片。
32. 抗生物質または抗菌剤がテトラサイクリンまたはミノサイクリンから選択される請求項 31 に記載の抗体またはその機能的断片。
33. 抗体のクラスが IgG である請求項 28 ～ 32 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその機能的断片。
34. IgG が IgG1 である請求項 33 に記載の抗体又はその機能的断片。
35. 抗体のクラスが IgA である請求項 28 ～ 32 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその機能的断片。
36. 重鎖定常領域のアミノ酸配列を改変した、請求項 28 ～ 35 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその機能的断片。
37. ハイブリドーマ 5-89-2 (受託番号 FERM BP-8323)。
38. ハイブリドーマ a44-1 (受託番号 FERM BP-8324) が産生する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片。
39. ハイブリドーマ a44-1 (受託番号 FERM BP-8324) が産生する抗体の可変領域を有する、40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片。
40. 治療薬剤と共有的または非共有的に結合した、請求項 40 または 41 に記載の抗体またはその機能的断片。
41. 治療薬剤が抗生物質または抗菌剤から選択される、請求項 40

記載の抗体またはその機能的断片。

42. 抗生物質または抗菌剤がテトラサイクリンまたはミノサイクリンから選択される請求項41記載の抗体またはその機能的断片。

43. 抗体のクラスがIgGである請求項38～42のいずれか1項に記載の抗体またはその機能的断片。

44. IgGがIgG1である請求項43記載の抗体又はその機能的断片。

45. 抗体のクラスがIgAである請求項38～42のいずれか1項に記載の抗体またはその機能的断片。

46. 重鎖定常領域のアミノ酸配列を改変した、請求項38～45のいずれか1項に記載の抗体またはその機能的断片。

47. ハイブリドーマa44-1（受託番号FERM BP-8324）。

48. ハイブリドーマh13-17（受託番号FERM BP-8325）、ハイブリドーマ5-89-2（受託番号FERM BP-8323）およびハイブリドーマa44-1（受託番号FERM BP-8324）からなる群から選択されるハイブリドーマの保有する核酸であって、前記ハイブリドーマが産生する抗体の可変領域を含む抗体をコードする核酸または該抗体の機能的断片をコードする核酸。

49. 請求項48に記載の核酸によりコードされる、抗体またはその機能的断片である蛋白質。

50. 請求項48に記載の核酸を有する発現ベクター。

51. 請求項50に記載の発現ベクターを有する宿主。

52. 大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞および植物細胞並びに哺乳動物からなる群から選ばれる請求項51記載の宿主。

53. ハイブリドーマh13-17（受託番号FERM BP-8325）、ハイブリドーマ5-89-2（受託番号FERM BP-8323）およびハイブリドーマa44-1（受託番号FERM BP-8324）からなる群から選択されるハイブリドーマから40-kDa OMPと結合する抗体をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を有する発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主に導入して該抗体を発現せしめ、得られる宿主、宿主の培養上清または宿主の分泌物から該

抗体を採取することを含む、40-kDa OMP と結合する抗体の製造方法。

54. 40-KDaOMP と結合する抗体またはその機能的断片を有効成分として含有する、歯槽骨の吸収抑制剤。

55. 抗 40-kDa OMP と結合する抗体またはその機能的断片を有効成分として含有する、歯周病の予防、診断または治療剤。

56. 40-KDaOMP と結合する抗体またはその機能的断片の歯槽骨の吸収抑制剤の製造のための使用。

57. 40-KDaOMP と結合する抗体またはその機能的断片を調製し、動物に投与することを含む、歯槽骨の吸収抑制方法。

58. 40-KDaOMP と結合する抗体またはその機能的断片の歯周病の予防、診断または治療剤の製造のための使用。

59. 40-KDaOMP と結合する抗体またはその機能的断片を調製し、動物に投与することを含む、歯周病を診断、予防または治療する方法。

60. 請求項 1～26、28～36、38～46 および 49 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその機能的断片を有効成分として含有する、歯周病の予防、診断または治療剤。

61. 請求項 1～26、28～36、38～46 および 49 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその機能的断片を有効成分として含有する、歯槽骨の吸収抑制剤。

62. 請求項 1～26、28～36、38～46 および 49 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその機能的断片の歯周病の予防、診断または治療剤の製造のための使用。

63. 請求項 1～26、28～36、38～46 および 49 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその機能的断片の歯槽骨の吸収抑制剤の製造のための使用。

64. 請求項 1～26、28～36、38～46 および 49 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその機能的断片を調製し、動物に投与することを含む、歯周病を診断、予防または治療する方法。

65. 請求項1～26、28～36、38～46および49のいずれか1項に記載の抗体またはその機能的断片を調製し、動物に投与することを含む、歯槽骨の吸収抑制方法。

図 1

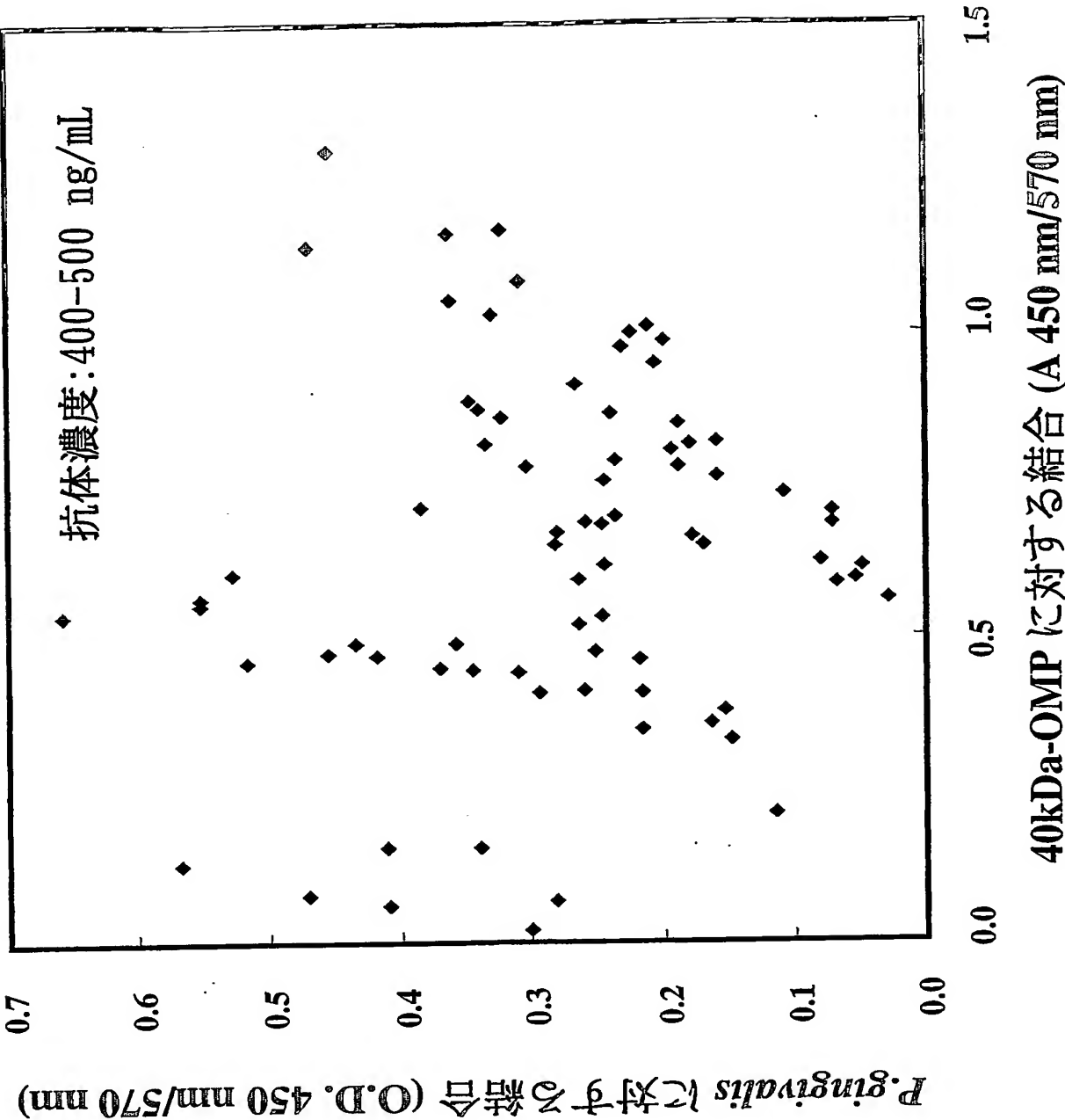
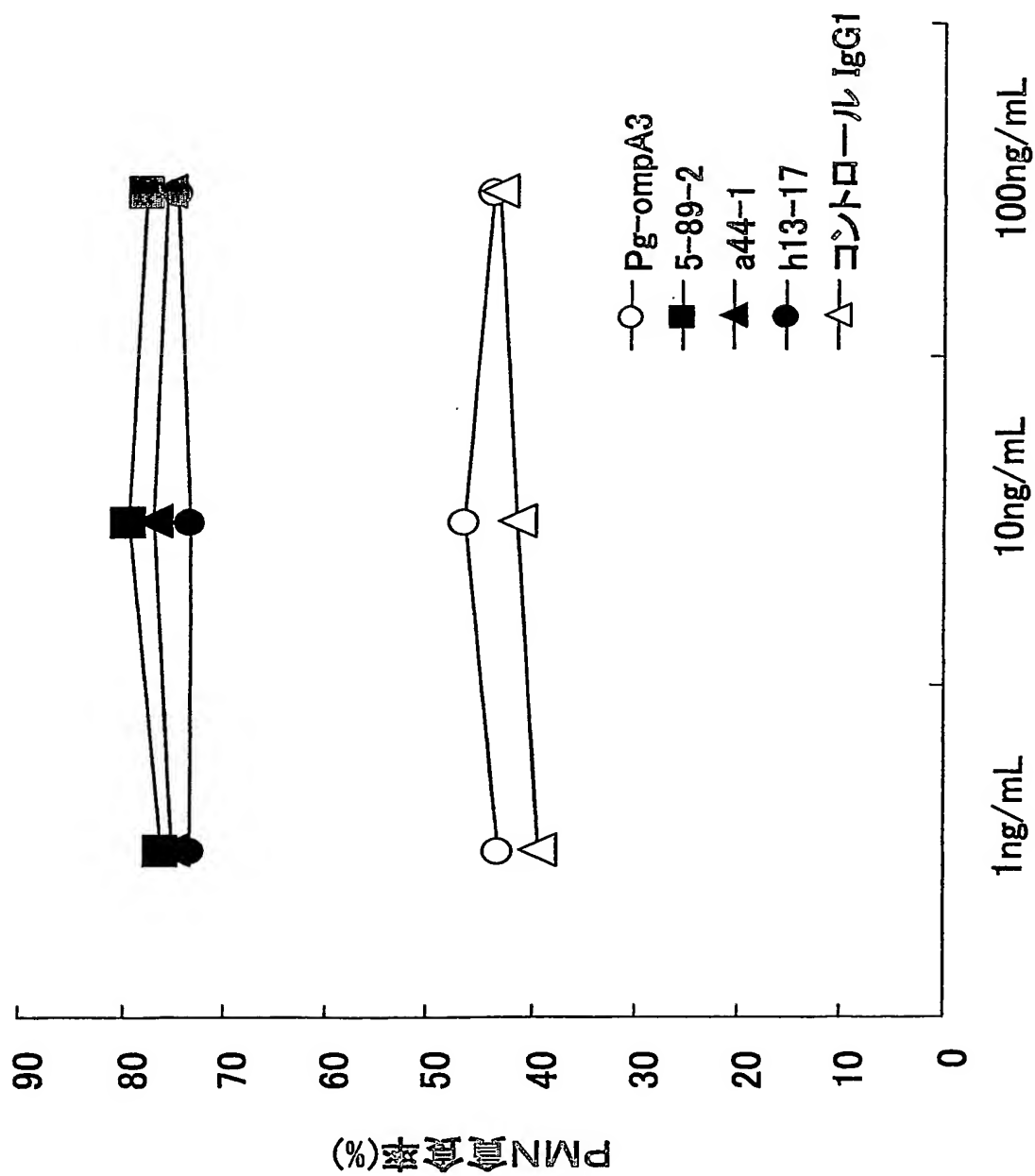


図2



抗体濃度

図3

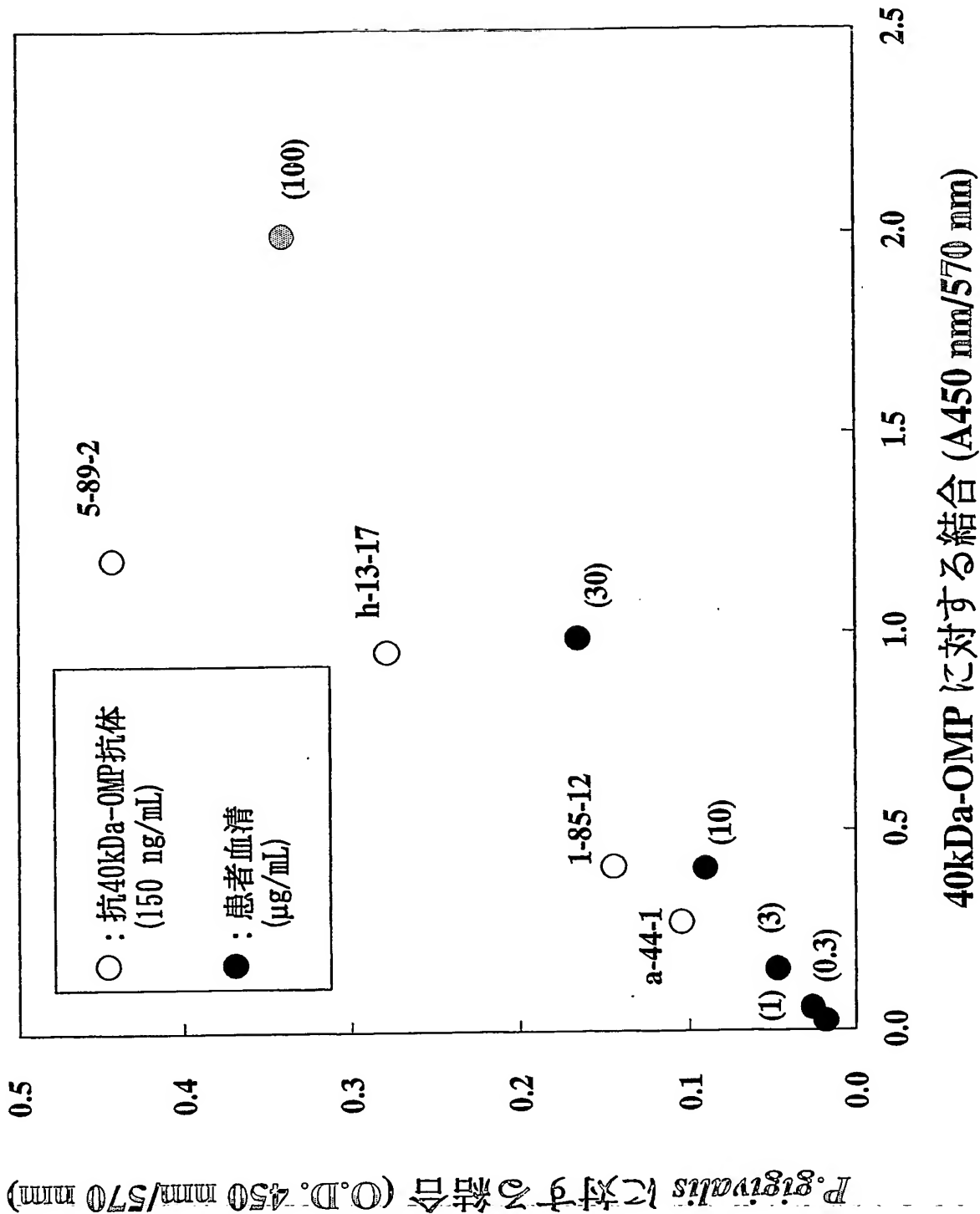


図4

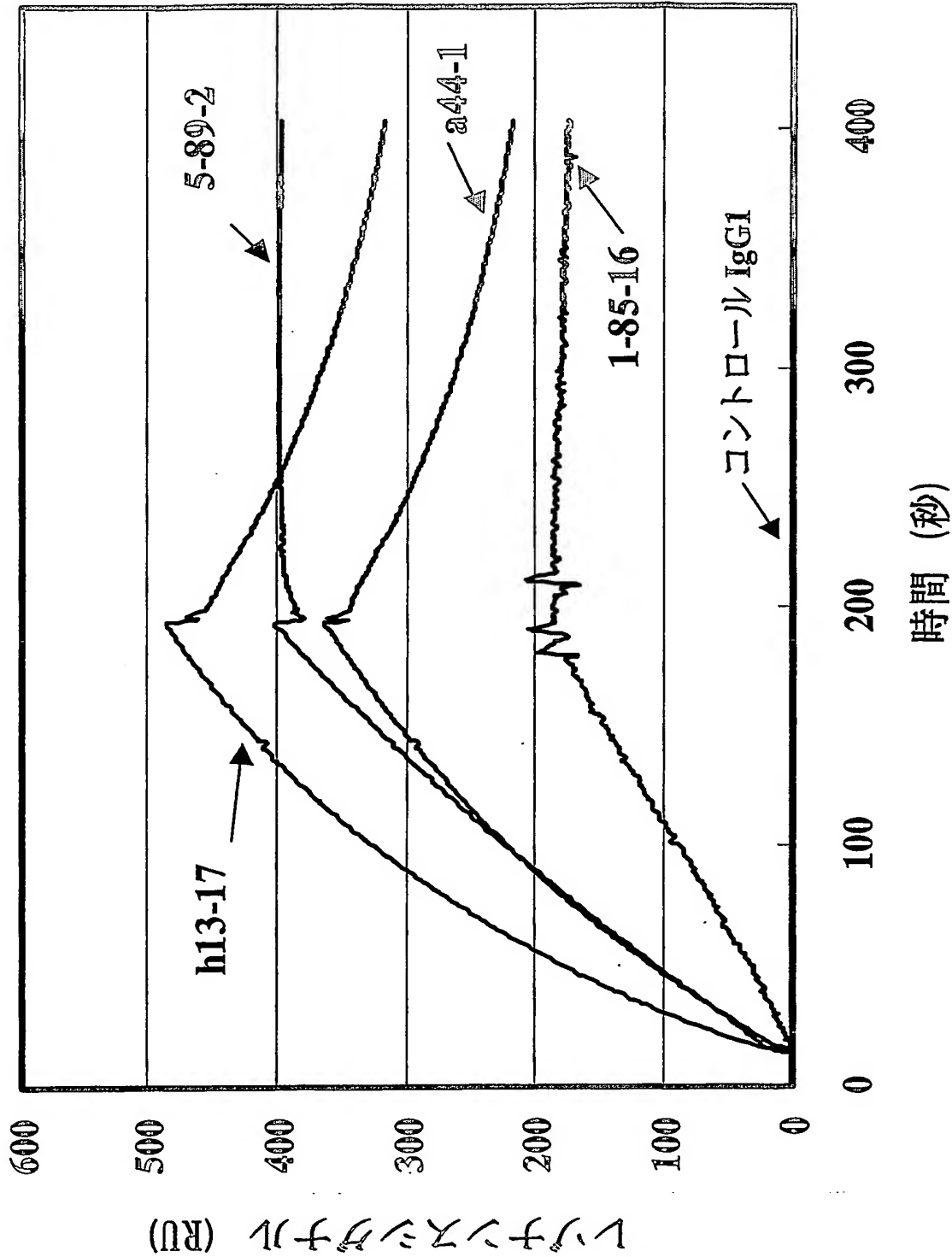


図5

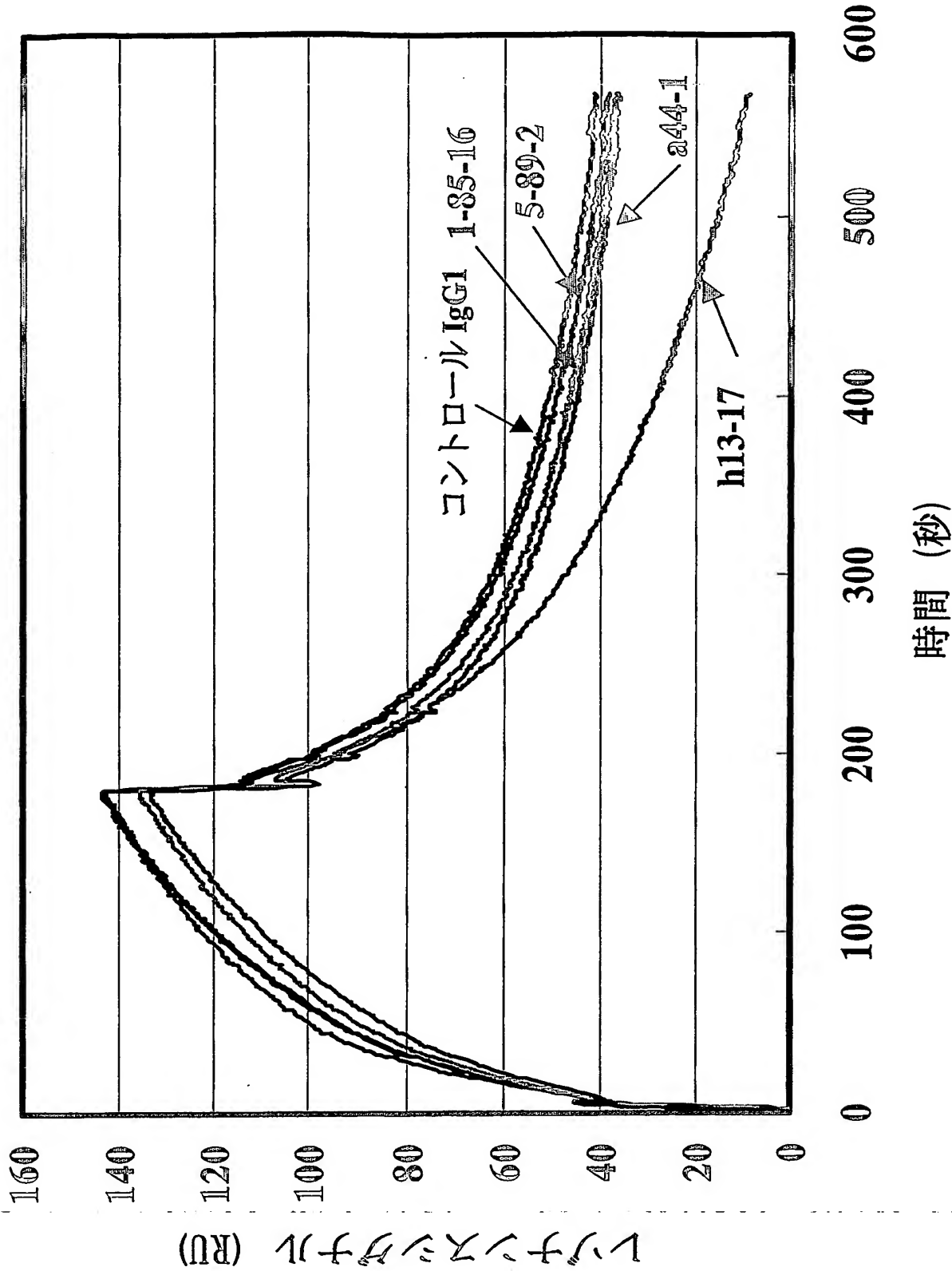
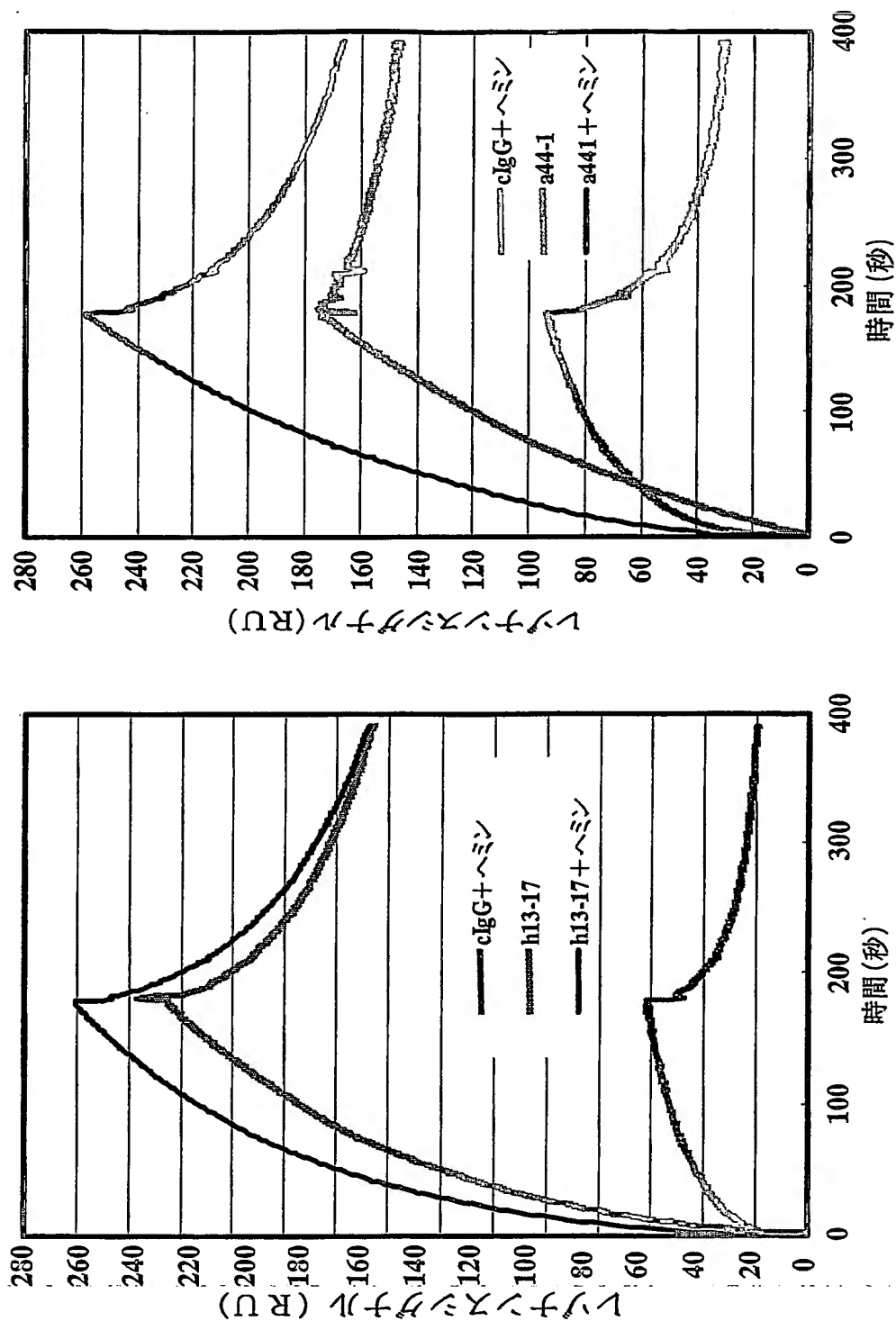
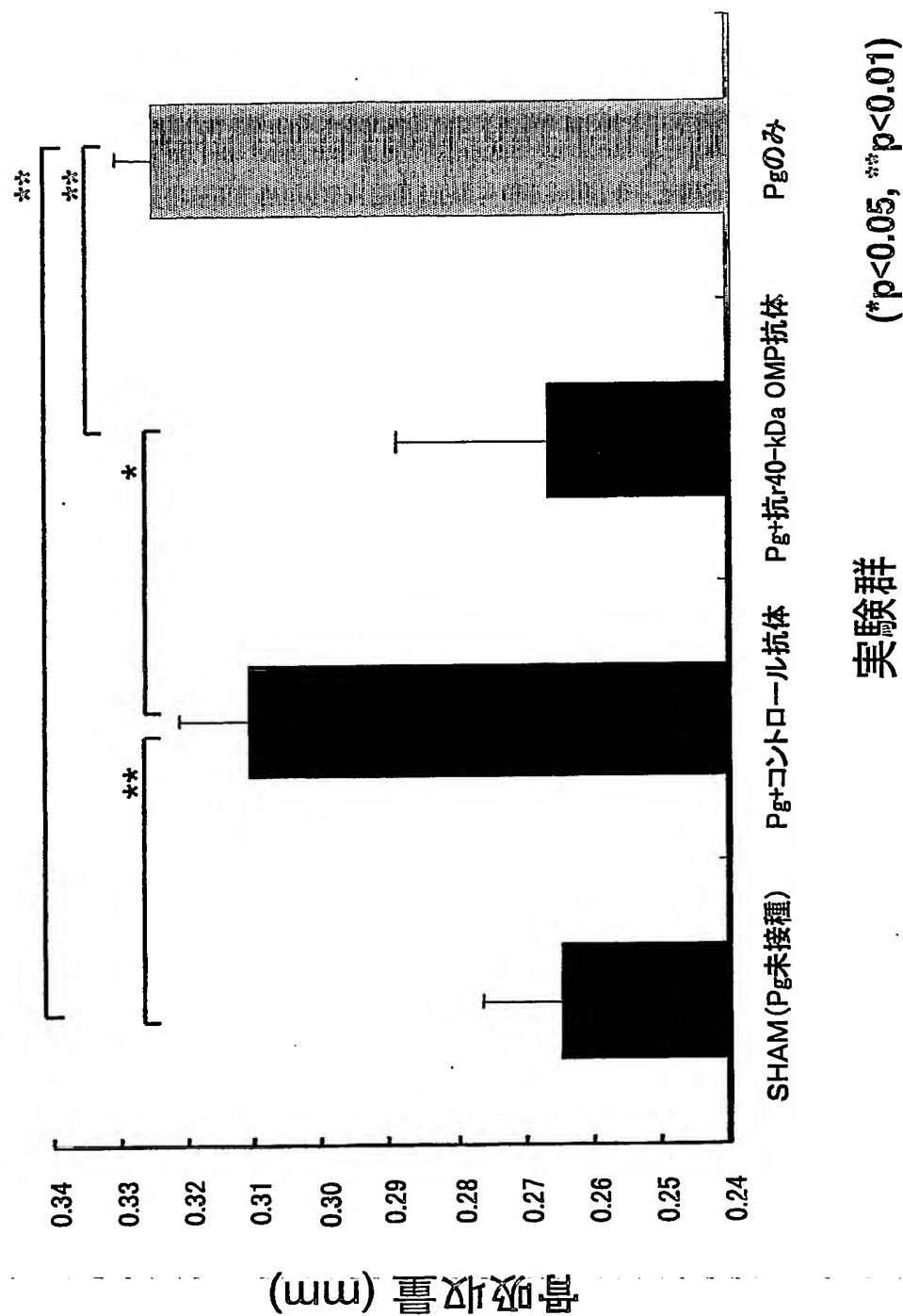


図6



ラット歯槽骨吸収抑制実験



SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKIKAISHA
NIHON UNIVERSITY

<120> A drug for treating periodontitis

<130> PH-2085-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2003/072714

<151> 2003-03-17

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2008

<212> DNA

<213> Porphyromonas gingivalis

<400> 1

```
gaattccaac cgtggaaagg ggagatagag cggcgcaaca acggatcgat cattgcgctc 60
gaaagcggaa cggcctatgc ctatgccttg aataatctcc aaagccgtgg acgcttcttc 120
atctctccgc aggaggaggt ctatgcoggt caggctcgtg gcgagcacac gaaggagggc 180
gatctctgcg tcaacgtctg caagagcaaa aagcttacca atatgcgtgc ttccggtagc 240
gatgataagg tgtcactggc tccaccggtg gtattcagcc tcgaagatgc tttggagtat 300
atcaagtatg acgagtatgt ggaggtgacg ccgaaaagca tgcgcatgog taaaattatc 360
ctcgacgaga cagaacgtaa acgacaagga cgataacaga ggcaaagtat ttgcagattt 420
catctatcta acgtatittg gtgcccgaat tacggaaaat caaacaaaat gtttcaacta 480
caaaaaagat aaacgaacat gaaaagatta ttactctctg ctgctatcct aagtagtatg 540
gctttgttta atgtcaatgc acaagagttg aaaacctctg ctgacatgaa aggttctttt 600
aagaagaatg tggtattgga ggtatttact gccgaatggt gcggttactg tccaggtggt 660
```

aaagagcgca ttgcaaaagc aattgaaatg ttggatgatg aatataagga gcgtgttttt 720
cagacatttg tticattataa tgatgggato tcaaaaaaat ggccctcgtg tggccaactt 780
tticattgcat tggatcaaac attgggcatt ccgggttttc cgactttttc agtttgccgt 840
atggagaaaa aaggtgaaaa tctttcaata ggtgctccaa tagcaattaa aaataagatt 900
atgaaagggt ttggtgatgg tacagcccct gcagaggtaa accttaaatt gaccaaagg 960
gcaacaccgg aagatgtatg tacagctaca ttactggta aagtcgatgc agacctcata 1020
gggaaacctc ttatgttgac tgcatatgta ttgaaaaaca atatgaagcc tattaatccg 1080
caaatggag ctggggatgg atatctccac caacatactg tgtaaatgat tctctccaca 1140
gatgtaaaag gagacgcttt aaatattgca gccgatggaa gttttaccat caagaaagaa 1200
tttaagttgg atggctttga aataaaagat acagatgttc ttgctttcgt acaccatcca 1260
atgtccaatg oggaaaacca ttctattatc aatgccgggc aagaaagcct tgataaagca 1320
gagcctacag ctacagaaca aattgttgot accccctctg tcaaagcata tgttcagaat 1380
ggcaaaattg ttgtagagga agagtattcc aagatggaag tattcaatgc aactggtcaa 1440
cttgtcaaaa atgaatccct tgtcccgggt gtctatgttg tccgtataac ggcaaacggt 1500
gtaatgcatt tcttaaaagt cttagtccct tgattttattg agctaagatt taaacgaaaa 1560
ctgocgcttc ttaatgtttc ataagaaggc gcagtttcct tttttcctca ttccattctc 1620
cgggtggtcg togaagggga ctgcctgtca tctttcaaac gaggaatctc agctcccctc 1680
accaacacg atgtccacaa atccatgttc atagcctatt tgagacctt gaaaaagag 1740
aaggtttctt atatctatta totataaagg cactaaaaat cagtcgattg acaataaaat 1800
ctccaagaaa ataccatgcg acagactcac tatatagatg cggatcaatgg tctgatatat 1860
cgaggctgtt gtggatggag gatagtacac atagttttgc acctgaaaca aacgttcata 1920
ctaaactaaa aacaaaagca ttatgactcc tatcctgaac accgttttcc ccgagttcaa 1980
actcaatgcc tatcacaatg gogaatto 2008

<210> 2

<211> 344

<212> PRT

<213> Porphyromonas gingivalis

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(22)

<400> 2

Met Lys Arg Leu Leu Leu Ser Ala Ala Ile Leu Ser Ser Met Ala Leu

1	5	10	15
Phe Asn Val Asn Ala Gln Glu Leu Lys Thr Ser Ala Asp Met Lys Gly			
20	25	30	
Ser Phe Lys Lys Asn Val Val Leu Glu Val Phe Thr Ala Glu Trp Cys			
35	40	45	
Gly Tyr Cys Pro Gly Gly Lys Glu Arg Ile Ala Lys Ala Ile Glu Met			
50	55	60	
Leu Asp Asp Glu Tyr Lys Glu Arg Val Phe Gln Thr Phe Val His Tyr			
65	70	75	80
Asn Asp Gly Ile Ser Lys Lys Trp Pro Arg Val Gly Gln Leu Phe Ile			
85	90	95	
Ala Leu Asp Gln Thr Leu Gly Ile Pro Gly Phe Pro Thr Phe Ser Val			
100	105	110	
Cys Arg Met Glu Lys Lys Gly Glu Asn Leu Ser Ile Gly Ala Pro Ile			
115	120	125	
Ala Ile Lys Asn Lys Ile Met Lys Gly Phe Gly Asp Gly Thr Ala Pro			
130	135	140	
Ala Glu Val Asn Leu Lys Leu Thr Lys Gly Ala Thr Pro Glu Asp Val			
145	150	155	160
Cys Thr Ala Thr Phe Thr Gly Lys Val Asp Ala Asp Leu Ile Gly Lys			
165	170	175	
Pro Leu Met Leu Thr Ala Tyr Val Leu Lys Asn Asn Met Lys Pro Ile			
180	185	190	
Asn Pro Gln Asn Gly Ala Gly Asp Gly Tyr Leu His Gln His Thr Val			

195	200	205
Leu Met Ile Leu Ser Thr Asp Val Lys Gly Asp Ala Leu Asn Ile Ala		
210	215	220
Ala Asp Gly Ser Phe Thr Ile Lys Lys Glu Phe Lys Leu Asp Gly Phe		
225	230	235 240
Glu Ile Lys Asp Thr Asp Val Leu Ala Phe Val His His Pro Met Ser		
245	250	255
Asn Ala Glu Asn His Ser Ile Ile Asn Ala Gly Gln Glu Ser Leu Asp		
260	265	270
Lys Ala Glu Pro Thr Ala Thr Glu Gln Ile Val Ala Thr Pro Ser Val		
275	280	285
Lys Ala Tyr Val Gln Asn Gly Lys Ile Val Val Glu Glu Glu Tyr Ser		
290	295	300
Lys Met Glu Val Phe Asn Ala Thr Gly Gln Leu Val Lys Asn Glu Ser		
305	310	315 320
Leu Val Pro Gly Val Tyr Val Val Arg Ile Thr Ala Asn Gly Val Met		
325	330	335
His Phe Leu Lys Val Leu Val Pro		
340		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003569

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C17K16/18, C12N5/10, C12N5/16, C12P21/08,
A61K39/395, A61P1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C17K16/18, C12N5/10, C12N5/16, C12P21/08,
A61K39/395, A61P1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Abiko Y. et al., A human monoclonal antibody which inhibits the coaggregation activity of Porphyromonas gingivalis., Infect Immun., Vol.65, No.9, pages 3966 to 3969, (1997)	1-10, 14, 15, 17, 54-56, 58, 60-63
Y		1-56, 58, 60-63
X	Kamino, Y. et al., Contribution of porphyromonas gingivalis 40-kDa outer membrane protein to coaggregation of P.gingivalis vesicles with Streptococcus gordonii cells., Jpn.J.Oral biol., Vol.40, pages 187 to 195, (1998)	1-7, 9, 10, 14-17, 54-56, 58, 60-63
Y		1-56, 58, 60-63
X	Nonaka, E. et al., Identification of 40-kDa outer mambrane protein as an aggregation factor of Porphyromonas gingivalis to Streptococcus gordonii., J.Oral Sci., Vol.43, No.4, pages 239 to 243, (2001)	1-7, 9, 10, 14-17, 54-56, 58, 60-63
Y		1-56, 58, 60-63

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 April, 2004 (26.04.04)

Date of mailing of the international search report
18 May, 2004 (18.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003569

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/43478 A2 (Kirin Beer), 06 June, 2002 (06.06.02), & EP 1354034 A2 & US 2002/0199213 A1	1-56, 58, 60-63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003569

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 57, 59, 64, 65
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 57, 59, 64 and 65 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09、C07K16/18、C12N5/10、C12N5/16、C12P21/08、A61K39/395、A61P1/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09、C07K16/18、C12N5/10、C12N5/16、C12P21/08、A61K39/395、A61P1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)、JSTPlus (JOIS)、MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Abiko Y et al., A human monoclonal antibody which inhibits the coaggregation activity of Porphyromonas gingivalis.	1-10, 14, 15, 17, 54-56, 58, 60-63
Y	Infect Immun., Vol. 65, No. 9, pp. 3966-3969 (1997)	1-56, 58, 60-63
X	Kamino, Y. et al., Contribution of porphyromonas gingivalis 40-kDa outer membrane protein to coaggregation of P. gingivalis vesicles	1-7, 9, 10, 14- 17, 54-56, 58, 60-63
Y	with Streptococcus gordonii cells. Jpn. J. Oral biol., Vol. 40, pp. 187-195 (1998)	1-56, 58, 60-63

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 04. 2004

国際調査報告の発送日

18. 5. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4N

8412

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Nonaka, E. et al., Identification of 40-kDa outer membrane protein as an aggregation factor of Porphyromonas gingivalis to Streptococcus gordonii. J. Oral Sci., Vol. 43, No. 4, pp. 239-243 (2001)	1-7, 9, 10, 14- 17, 54-56, 58, 60-63
Y		1-56, 58, 60-63
Y		1-56, 58, 60-63
	WO 02/43478 A2 (Kirin Beer) 2002.06.06 & EP 1354034 A2 & US 2002/0199213 A1	

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 57, 59, 64, 65 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
人体の治療方法に係る発明が記載されている。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。